



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA,  
NUTRICIÓN E BROMATOLOGÍA

**UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

---

**ALIMENTOS FUNCIONALES DE ORIGEN ANIMAL CON PERFIL LIPÍDICO**  
**MODIFICADO: ESTRATEGIA, HERRAMIENTAS Y DISEÑO**

**Memoria que para optar  
al grado de doctor presenta:  
Beatriz Martínez Ruiz.  
Lugo, 2011**

**ISBN 978-84-9887-796-0 (Edición digital PDF)**





DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA,  
NUTRICIÓN E BROMATOLOGÍA

**D. Alberto Cepeda Sáez, Catedrático de universidad, D. José Manuel Miranda López, investigador, pertenecientes al Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela y D. José Luis Rodríguez Rodríguez, Profesor titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Santiago de Compostela.**

**AUTORIZAN** a D<sup>a</sup>. Beatriz Martínez Ruiz a la presentación del Trabajo titulado: “Alimentos funcionales de origen animal con perfil lipídico modificado: estrategia, herramientas y diseño”, realizado bajo su dirección en la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela.

Y para que así conste, firman la presente en Lugo, en Abril de 2011.

Fdo. D. Alberto Cepeda Sáez

Fdo. D. José Manuel Miranda López

Fdo. D. José Luis Rodríguez Rodríguez





DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA,  
NUTRICIÓN E BROMATOLOGÍA

D. Antonio Moreda Piñeiro, Director del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

**INFORMA** que D<sup>a</sup>. Beatriz Martínez Ruiz ha realizado en este Departamento y bajo la dirección de D. Alberto Cepeda Sáez, D. José Manuel Miranda López y D. José Luis Rodríguez Rodríguez el trabajo titulado: “Alimentos funcionales de origen animal con perfil lipídico modificado: estrategia, herramientas y diseño”, que presenta para optar al grado de doctor.

Y para que así conste donde proceda, firma la presente en Santiago de Compostela, el 19 de Abril de 2011.

Fdo. Antonio Moreda Piñeiro



## **AGRADECIMIENTOS**

*El camino ha sido largo, y gracias a la realización de esta tesis doctoral conocí en ese camino a muchas personas, muchos siguieron conmigo hasta el final, a otros sólo me los crucé un momento en el camino y unos cuantos se unieron a mí a la mitad. Guardo de todos un cariñoso recuerdo y sólo espero que ellos también me recuerden a mí con cariño. A todos Gracias!*

*Deseo agradecer de manera especial y sincera a mis directores de tesis. Al Dr. Alberto Cepeda Sáez por aceptarme para realizar esta tesis doctoral en el laboratorio que dirige y sobre todo bajo su propia supervisión. Su apoyo y confianza en mi trabajo y su capacidad para guiar mis ideas han sido un aporte incalculable. Al Dr. José Luís Rodríguez Rodríguez, por iluminarme, por enseñarme todo lo que sé sobre la cromatografía de gases y los ácidos grasos, conocimientos que han sido la clave de este trabajo. Al Dr. José Manuel Miranda López, sin ninguna duda, sin él no habría sido posible, por su trabajo incansable, por su amistad y sus consejos y por los empujones que me daba cuando me faltaban las fuerzas o las ganas.*

*Gracias al Dr. Manuel Vázquez Vázquez, por sus ideas, su colaboración incondicional y su trabajo; por contagiarme su entusiasmo por la investigación desde los Cursos de Doctorado hasta el final de este trabajo.*

*Igualmente quiero agradecer a todo el personal que formó parte del Laboratorio de Higiene, Inspección y Control de alimentos durante la realización de esta tesis, que con su apoyo y cariño, han hecho más llevaderas las jornadas de trabajo. A Carmen, a Rocío y a Rodrigo por su grano de arena, que más bien es una playa entera. Y especialmente a las niñas (Mónica, Carmiña y Minia), porque su apoyo moral (y a veces*

*también físico) fue decisivo en los momentos bajos, y los buenos ratos que pasamos, tan divertidos, espero que se repitan durante muchos años.*

*Deseo hacer constar también mi agradecimiento a la Asociación Gallega de la Carne que junto con la Consellería de Innovación, financiaron alguno de los proyectos que forman parte de esta tesis. Además, el agradecimiento a la Consellería de Innovación de la Xunta de Galicia es por partida doble, por financiar mi trabajo con un contrato Lucas Labrada. A la Universidad de Santiago, a la que llegué con 17 años solo con ilusión, y me voy ahora, después de 15 (casi la mitad de mi vida) con dos licenciaturas y un doctorado. La voy a echar de menos.*

*Gracias a mi familia y a mis amigos, por apoyarme siempre aunque les suponga perderme un poco. A mi abuela que no llegó a verme licenciada, y a las mujeres que la antecederon por ser siempre un ejemplo para mí. Muy especialmente, gracias a mi madre y a Juan porque la ilusión que pusieron en verme doctorada es lo que hizo que no pensase nunca en desistir.*

---

**ÍNDICE**

AREVIATURAS	iii
<b>RESUMEN</b>	<b>ix</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1. La alimentación española en los últimos años	3
1.2. Los alimentos funcionales	6
1.2.1. Contextualización y definición	6
1.2.2. Legislación relativa a los alimentos funcionales	9
1.2.3. Estrategias para el diseño de alimentos funcionales	15
1.3. Clasificación y estructura de los lípidos	16
1.3.1. Los triglicéridos	18
1.3.2. Los ácidos grasos	19
1.3.3. Otros lípidos	21
1.4. Los lípidos desde el punto de vista nutricional	23
1.4.1. Fuentes de los ácidos grasos más importantes desde el punto de vista nutricional	24
1.4.2. Recomendaciones dietéticas para el consumo de lípidos	25
1.4.3. Ácidos grasos esenciales	29
1.4.4. Propiedades funcionales de los ácidos grasos omega-3	33
1.4.5 Relación entre la digestión de los lípidos y la composición de los productos animales	36
1.5. La carne	37
1.5.1. Composición nutricional de la carne de vacuno	38
1.5.2. La composición de los preparados de carne para hamburguesa	39
1.5.3. Productos cárnicos con propiedades funcionales	41
1.6. El pescado	43
1.6.1. Composición del pescado	45
1.6.2. El pescado como alimento funcional.	46
1.6.3. Comparación entre pescados salvajes y procedentes de la acuicultura	47
1.7. La leche	48
1.7.1. La grasa de la leche	49

1.7.2. El ácido linoleico conjugado	50
1.7.3. Métodos de determinación de la composición en ácidos grasos en leche	52
<b>II. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>55</b>
<b>III. OBJETIVOS</b>	<b>67</b>
3.1. Objetivo general	69
3.2. Objetivos específicos	69
<b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>71</b>
4.1. Desarrollo de una hamburguesa con formulación lipídica más sana y estudio de sus propiedades nutricionales, sensoriales y de estabilidad.	73
4.2. Evaluación de transglutaminasa y caseinato para una formulación original de pasteles de carne de ternera enriquecidos en lípidos más sanos y fibra dietética.	85
4.3. Diferenciación entre rodaballo cultivado y salvaje ( <i>Psetta maxima</i> ): composición proximal y lipídica, composición en minerales traza y resistencia a antibióticos de las bacterias contaminantes.	97
4.4. Desarrollo de un método abreviado para la determinación cuantitativa de ácidos grasos en leche con especial énfasis en los ácidos grasos de cadena larga	109
<b>V. CONCLUSIONES</b>	<b>143</b>

## ABREVIATURAS

a*	Índice de rojo
A.	<i>Aeromonas</i>
ADA	<i>American dietetic association</i>
Adh	<i>Adhesiveness</i>
AESAN	Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición
AGI	Ácidos grasos insaturados
AGMI	Ácidos grasos monoinsaturados
AGPI	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
AGt	Ácidos grasos <i>trans</i>
ALA	Ácido $\alpha$ -linolénico
AMSA	<i>American Meat Science Association</i>
ANOVA	Análisis de varianza
AOAC	<i>Association of Official Analytical Chemists</i>
aq	acuoso
ARA	Ácido Araquidónico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
b*	Índice de amarillo
C	Caseinato
°C	Grado centígrado
°C.min <sup>-1</sup>	Grados centígrados/minuto
CDR	Cantidad diaria recomendada
CE	Comunidad Europea
CEE	Comunidad Económica Europea
CG	Cromatografía de gases
Ch	<i>Cohesiveness</i>
Chw	<i>Chewiness</i>
CIE	<i>Commission Internationale de l'Eclairage</i>
CLA	Ácido linoleico conjugado
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
cm	centímetro
Co	<i>Company</i>
col.	Colaboradores
DANMAP	<i>Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring Programme</i>
DHA	Ácido Docosaheptaenoico
DPA	Ácido Docosapentaenoico
EC	<i>European Community</i>
EEUU	Estados Unidos
EPA	Ácido Eicosapentaenoico
et al	Y otros
E <sub>w</sub>	<i>Expressible water</i>
FAMES	<i>Fatty acid methyl esters</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FEN	Fundación Española de la Nutrición
f <sub>i</sub> <sup>m</sup>	<i>Relative mass response factor</i>
FID	<i>Flame ionization detector</i>

FUFOSE	<i>Functional Food Science in Europe</i>
g	Gramo
g Kg <sup>-1</sup>	Gramos/kilo
g/Kg	Gramos/kilo
GC	<i>Gas chromatography</i>
GSP	<i>Glutamate starch phenol red agar</i>
G.U.I.D.A.F	Guía para el diseño de alimentos funcionales
h	Hora
Hd	<i>Hardness</i>
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HPLC	<i>High Performance liquid chromatography</i>
ICP-AES	<i>Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometry</i>
id.	<i>Internal diameter</i>
ILSI	<i>International Life Sciences Institute</i>
IS	<i>Internal Standard</i>
ISO-IDF	<i>International Organization for Standardization - International Dairy Federation</i>
ISSFAL	Asociación Internacional para el estudio de los ácidos grasos y de los lípidos
kcal	Kilocalorías
Kg	Kilogramos
kJ	Kilojulios
kJ/Kg	Kilojulios/kilogramo
L	Litro
L*	Luminosidad
LDL	lipoproteínas de baja densidad
LOD	<i>Limit of detection</i>
LOQ	<i>Limit of quantification</i>
m	Metro
MAPA	Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación
MARM	Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino
mg	miligramos
mg/kg	Miligramos/kilo
mg/ml	Miligramos/mililitro
mg L <sup>-1</sup>	Miligramos/litro
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
min	minuto
mL	Mililitro
mL/L	Mililitros/litro
ml L <sup>-1</sup>	Mililitros/litro
mL/m	Mililitros/minuto
mL.min <sup>-1</sup>	Mililitros/minuto
ml/min	Mililitros/minuto
mm	Milímetros
MUFA	<i>Monounsaturated fatty acids</i>
µg	Microgramo
µg mL <sup>-1</sup>	Microgramo /mililitro
µL	Microlitros
µm	Micrometro
n	número de muestras

N	Normal
N	Newton
N*s	Newton por segundo
N.sec	Newton por segundo
<i>n-3</i>	Omega-3
<i>n-6</i>	Omega-6
<i>n-7</i>	Omega-7
<i>n-9</i>	Omega-9
<i>n-11</i>	Omega-11
NAOS	Estrategia para la nutrición, actividad física y prevención de la obesidad
NCCLS	<i>National Commitee of Clinical Laboratory Standards</i>
nm	Nanómetros
no.	número
ns	<i>Not significant</i>
NSM	<i>No significant model</i>
<i>P</i>	Probabilidad
psi	<i>Pounds per Square Inch</i>
PUFA	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
<i>r</i>	Coefficiente de regresión
<i>R</i>	Recuperaciones
<i>r</i> <sup>2</sup>	Coefficiente de determinación
rpm	Revoluciones por minuto
RSD	Desviación estándar relativa
s	segundos
S.A.	Sociedad anónima
SENC	Sociedad Española de Nutrición Comunitaria
SFA	<i>Saturated fatty acids</i>
S/N	Señal/ruido
spp.	Especies
Spr	<i>Springiness</i>
Sqr	Raíz cuadrada
Soc. Coop. Ltda.	Sociedad Cooperativa Limitada
St	<i>Saint</i>
Std	Disolución estándar
t	Tiempo
t	Toneladas
T	Temperature
TBA	<i>Thiobarbituric acid</i>
TBARS	<i>ThioBarbituric Acid Reactive Substances</i>
TCA	<i>Trichloroacetic acid</i>
TG	Transglutaminasa
TPA	<i>Texture Profile Analysis</i>
<i>t<sub>r</sub></i>	Tiempo de retención
U/g	Unidades/gramo
UK	<i>United Kingdon</i>
USA	Estados Unidos de América
VA	<i>Vaccenic acid</i>
vs	<i>versus</i>
v/v	proporción volumen/volumen

w  
WHO  
 $X^2$

vacios  
*World Health Organization*  
Chi-cuadrado



## RESUMEN



En los últimos años se ha incrementado el interés por parte de las industrias alimentarias y los consumidores por el concepto de “alimento funcional”. Debido a que, el creciente interés del consumidor por alimentos más saludables ha hecho que la industria alimentaria comprendiese la potencialidad del mercado de los alimentos funcionales. A raíz de ello, se ha iniciado a nivel mundial una intensa actividad investigadora en el área de estos nuevos alimentos.

Por otro lado, debe destacarse que las grasas alimentarias son los nutrientes que mayor atención han recibido en los últimos años, debido a las connotaciones negativas que tiene para la salud humana de una ingesta elevada de estos nutrientes. Sin embargo, dado que las grasas son esenciales por participar en diversos procesos fisiológicos y patológicos, se han convertido en el centro de muchas investigaciones encaminadas a identificar sus propiedades positivas y negativas.

En el trabajo que aquí se presenta se abordará el tema de los alimentos funcionales desde el punto de vista de la salud, pero también desde la perspectiva de la problemática que plantea su obtención para las industrias alimentarias, para las cuales desarrollar este tipo de alimentos significa una importante fuente de diversificación de sus productos. Además, con el desarrollo de nuevos productos funcionales aparece la necesidad de desarrollar métodos rutinarios, rápidos, simples y fiables para la cuantificación de los nutrientes modificados en dichos alimentos. En muchos casos no existen métodos de determinación adecuados para la matriz de cada alimento, puesto que hablamos de nutrientes añadidos, que no son naturales del alimento. En otros casos, se trata de nutrientes que aun siendo naturales en un alimento, anteriormente no eran determinados por no encontrarse en cantidades importantes.

Debido a que la problemática a abordar es muy extensa este trabajo se ha centrado en el estudio del perfil de ácidos grasos de alimentos funcionales de origen animal. Es un hecho demostrado que la ingesta de ácidos grasos insaturados puede reducir el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y posiblemente la incidencia de algunos cánceres, el asma y la diabetes, entre otras enfermedades. Por otra parte, los productos animales han sido criticados por su alto contenido en ácidos grasos saturados, considerándolos perjudiciales para la salud. Por todo ello, en esta línea, se han llevado a

cabo cuatro trabajos de investigación relacionados con el estudio del perfil lipídico de los alimentos.

En el primer estudio se ha desarrollado un preparado cárnico funcional con una formulación lipídica más saludable. Posteriormente se ha realizado un estudio completo del producto desarrollado, que incluye propiedades nutricionales, características físico-químicas y organolépticas y además se ha determinado su vida útil. Paralelamente se ha realizado un estudio comparativo entre los valores de estos parámetros del producto desarrollado y los de los productos del mismo tipo que se encuentran en el mercado.

Habitualmente, el diseño de alimentos funcionales presenta una serie de dificultades asociadas a la adición de los componentes funcionales al alimento, dado que se pretende obtener alimentos funcionales lo más similares posible a los tradicionales y los ingredientes que aportan funcionalidad habitualmente son elementos exógenos. Por este motivo se llevó a cabo un segundo estudio en el cual se ha utilizado el diseño de experimentos y la metodología de superficies de respuesta para conseguir una textura del preparado cárnico similar a la que presentan los productos que hay en el mercado, utilizando transglutaminasa.

Puesto que un alimento funcional puede ser un alimento que *per se* presente efectos beneficiosos para la salud, se ha considerado como tal el pescado, por ser un alimento rico en omega-3. De este modo, se ha dedicado el tercer trabajo de esta tesis a la realización de un estudio comparativo entre las propiedades nutricionales y el perfil lipídico del rodaballo salvaje y el rodaballo de piscifactoría, ya que es un hecho conocido que la alimentación de los animales puede influir en el perfil lipídico de su carne y en sus valores nutricionales. Paralelamente, se ha estudiado también la resistencia a diferentes antimicrobianos de cultivos de *Aeromonas* spp. y *Pseudomonas* spp., aislados de músculo de rodaballos salvajes y de cultivo. Este tipo de estudios comparativos se hacen cada vez más necesarios, teniendo en cuenta que el aprovechamiento de la pesca extractiva ha tocado techo y que el incremento en la producción acuícola es y será necesaria en el futuro para satisfacer la demanda mundial de pescado.

Como se ha mencionado anteriormente, hay que destacar que a menudo existe un déficit de métodos de rutina rápidos, simples y fiables para la determinación de los

nutrientes de interés en los alimentos modificados. Esto nos ha llevado al desarrollo de un método rápido para la determinación de ácidos grasos en leche cruda de vaca. Este método permite el control del perfil lipídico de leche cruda en situaciones en las que es necesario obtener rápidamente resultados de un gran número de muestras, como por ejemplo durante estudios de modificación de la alimentación del ganado encaminados a modificar el perfil lipídico de su producción láctea.





# I. INTRODUCCIÓN



## 1.1. La alimentación española en los últimos años

Hace décadas, la calidad de la dieta se juzgaba por su capacidad de proporcionar nutrientes para evitar la inanición. En la actualidad, en los países industrializados existe una abundancia y variedad de alimentos casi ilimitada a lo largo de todo el año. Por lo tanto las deficiencias nutritivas en estos países son poco frecuentes. Por el contrario, las enfermedades crónico-degenerativas como obesidad, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, hipertensión arterial, osteoporosis, algunos tipos de cáncer, etc., son las enfermedades asociadas a la mala nutrición más preocupantes en este momento en los países industrializados. Este hecho se ve favorecido por los cambios en el estilo de vida con tendencia al sedentarismo, unidos al mayor tiempo que se pasa fuera de casa que conlleva una menor elaboración de los alimentos y un aumento en el consumo de comida rápida.

Los cambios que se han producido en la dieta son tanto de tipo cualitativo como cuantitativo. Así, se ha observado un aumento de dietas de alta energía con un significativo rol de grasa y azúcares añadidos en los alimentos, reducción de las ingestas globales de hidratos de carbono complejos, fibra, vegetales y frutas. La grasa de la dieta también ha tenido modificaciones importantes en los últimos años, ya que ha habido grandes variaciones en cuanto a las grasas añadidas, los aceites de consumo, las formas de cocinar, etc.

Globalmente se puede decir que la nutrición humana en las sociedades industrializadas se caracteriza por:

- a) Un aumento en el consumo energético.
- b) Aumento en el consumo de grasas saturadas, ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) omega-6 (*n-6*) y ácidos grasos *trans* (AGt), y una disminución en el consumo de ácidos grasos omega-3 (*n-3*).
- c) Disminución en el consumo de carbohidratos complejos y fibra.

d) Disminución en el consumo de frutas y verduras, y aumento en el de cereales.

e) Aumento en el consumo de proteínas y disminución en el de antioxidantes (Mata y col., 2002).

Estos desequilibrios son en parte responsables de la alta incidencia de obesidad (que ha alcanzado en estos países unos niveles alarmantes) así como de la aparición de enfermedades crónicas y degenerativas (Lo y col., 2008).

La cultura alimentaria de la población española de las zonas atlánticas se caracteriza por una alimentación más rica en proteínas, especialmente las procedentes de carnes rojas, de ganado bovino, mientras que en las zonas mediterráneas se consume una mayor cantidad de carnes magras como el pollo y el conejo. En el arco atlántico se consumen también más pescado, que es su alimento básico, huevos, productos lácteos y legumbres. Curiosamente, también se consume una mayor cantidad de aceite de oliva, a pesar de no ser zonas tan típicamente productoras de este producto como el resto de España (Barroso y Grande, 2003). En el marco de la dieta mediterránea los alimentos más representativos son, verduras, hortalizas, frutas, aceite de oliva y vino tinto, el consumo de leguminosas y pescados es también importante pero menor que en el marco atlántico, mientras que el consumo de carne y lácteos es moderado.

Dada la especial composición de este tipo de dietas, en la que predominan productos que tiene naturaleza funcional per se, como el pescado y el aceite de oliva, podemos clasificarlas como dietas funcionales. Sin embargo, en los últimos años se ha observado una rápida e importante modificación de los hábitos alimenticios de la población española, que afecta especialmente a la población más joven. Como resultado de estas modificaciones, el consumo de proteínas en España (93,5 g/persona/día) según la Federación Española de la Nutrición (FEN) se considera excesivo, excediendo en un 73 % las recomendaciones (FEN, 2007).

Por otra parte, se recomienda que la dieta aporte unos 25-30 g/día de fibra, y la población española no alcanza estas recomendaciones, debido a la baja ingesta de productos de origen vegetal. En relación a la ingesta de macronutrientes, la mayor variación, entre el año 1964 y el 2006 (Figura 1), se ha producido en los hidratos de carbono, para los que se ha reducido la ingesta en casi 150 g/persona y día,

probablemente debido al descenso en el consumo de alimentos pertenecientes al grupo de cereales y derivados, además de patatas. De este modo, el perfil calórico medio se caracteriza por un elevado aporte de lípidos a expensas de los hidratos de carbono (FEN, 2007).

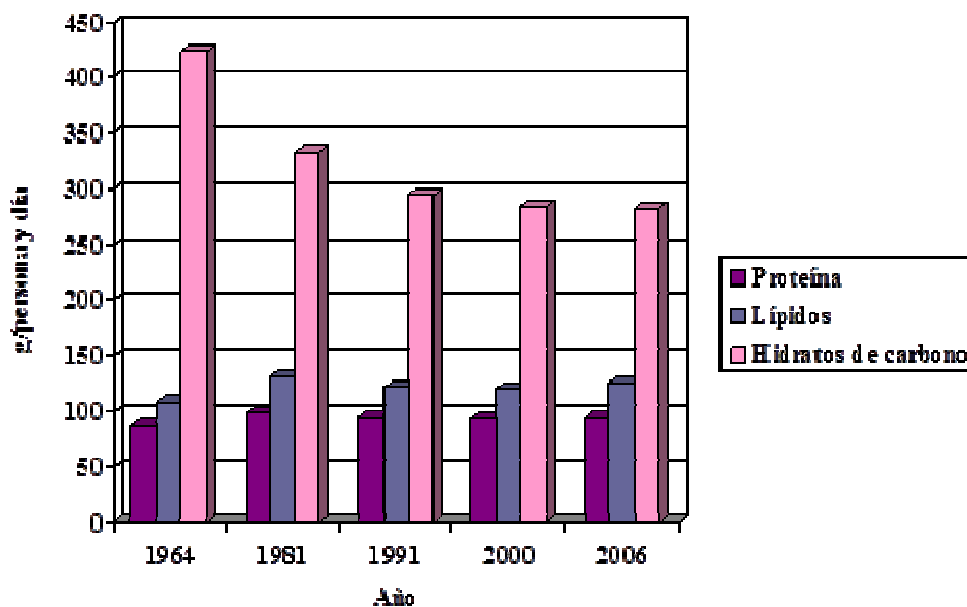


Figura 1. Evolución de la ingesta de macronutrientes (g/persona y día)

El 30% de los lípidos consumidos durante el 2006 (126,1 g) fue proporcionado por aceites y grasas, mientras las carnes y derivados suministraron el 28%, es decir, el grupo de carnes y derivados aportó casi la misma cantidad de lípidos que el de aceites y grasas, este es un aspecto preocupante en nuestra dieta. Aunque todos los alimentos tienen ácidos grasos de distinto grado de saturación, el grupo de carnes y derivados contiene un mayor porcentaje de ácidos grasos saturados (AGS), por el contrario, el de aceites y grasas incluye mayoritariamente AGPI (girasol, maíz, soja,...) y ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) (oliva). En la población española, el perfil lipídico medio muestra un porcentaje de AGS y AGPI superior a las recomendaciones. Viendo la evolución del perfil lipídico desde 1964 (Figura 2), se comprueba que el porcentaje de AGPI sobre la energía total casi se ha triplicado. Por otro lado, las relaciones  $(AGMI+AGPI)/AGS$  y  $AGPI/AGS$  mostraron valores satisfactorios. Se observa un consumo satisfactorio de ácidos grasos de la familia  $n-3$  situado entre 0,2 y 2 g/día. Sin embargo, el consumo de ácido eicosapentaenoico (EPA) más ácido docosahexaenoico (DHA) se encuentra marcadamente por debajo de las recomendaciones (0,15-0,16

g/día). Finalmente, la relación  $n-6/n-3$  se encuentra muy desplazada hacia los  $n-6$ , por lo que sería interesante limitar el consumo de esta familia de ácidos grasos o sustituirlos en la dieta por ácidos grasos de la familia  $n-3$  (FEN, 2007).

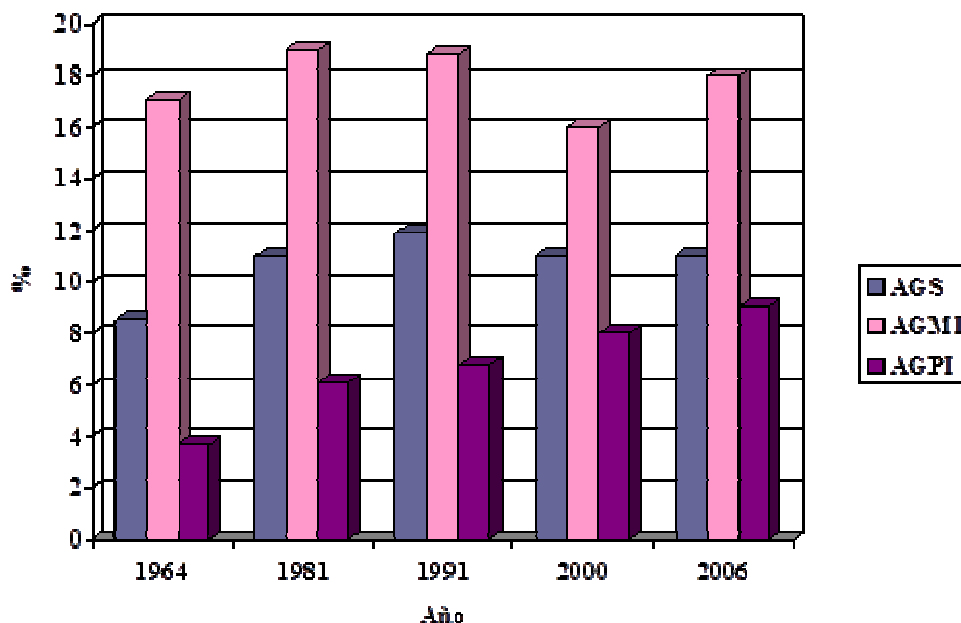


Figura 2. Evolución del perfil lipídico según su aporte calórico (%) sobre la energía total.

De forma general, se puede concluir que la dieta de los españoles, en los últimos 40 años, ha ido alejándose del modelo tradicional de la Dieta Mediterránea, por lo que se deben diseñar estrategias que fomenten la alimentación saludable, que permitan la recuperación de las características tradicionales, con la ayuda de las nuevas tecnologías de producción, conservación, comercialización y distribución de alimentos (FEN, 2007).

## 1.2. Los alimentos funcionales

### 1.2.1. Contextualización y definición

En los últimos años del siglo XX se ha abierto un nuevo campo en la ciencia de la Nutrición. Los alimentos funcionales surgen en los países desarrollados como

consecuencia de dos aspectos; en primer lugar por el cambio social que se ha producido y en segundo por un conocimiento más profundo del efecto de determinados nutrientes sobre la fisiología animal. Lo cual permite que se utilicen los alimentos funcionales de forma preventiva contra determinadas patologías agravadas por el cambio social que se ha producido en los últimos años.

Fue en los años setenta cuando se utilizó por primera vez el término “alimento funcional” en Japón. Gracias al apoyo de las autoridades, se comenzó a investigar, desarrollar y comercializar ciertos alimentos con acción sobre funciones específicas del organismo. Los más importantes tenían función digestiva, eran principalmente productos lácteos denominados probióticos y prebióticos.

En Europa, la investigación en alimentación funcional tiene su principal punto de partida en un grupo de trabajo promovido y coordinado por la Sección Europea del International Life Sciences Institute (ILSI) y patrocinado por la Comisión Europea como Acción Concertada dentro del 4º Programa Marco de Investigación. El proyecto se tituló Functional Food Science in Europe (FUFOSE) y propuso una serie de conceptos y definiciones de consenso con el fin de proporcionar bases y fundamentos apropiados para el futuro desarrollo científico de la alimentación funcional, que fueron recogidos en 1999 en el primer documento de consenso sobre conceptos científicos en relación con los alimentos funcionales.

En cuanto al mercado de estos alimentos, entre 1988 y 1998, más de 1700 alimentos funcionales fueron introducidos en el mercado japonés, lo cual dio como resultado unas ventas de 14 billones de dólares en 1999 (Menrad, 2003). En EEUU se encuentra el mercado más dinámico para estos alimentos (Benkouider, 2004). El mercado para alimentos funcionales en países europeos ha estado aumentando constantemente, y los consumidores de países del centro y del norte de Europa son más favorables a este tipo de alimentos que los de los países mediterráneos, donde son preferidos los alimentos frescos y naturales (Menrad, 2003).

La primera definición en Europa de alimento funcional fue realizada por un grupo de expertos coordinados por el ILSI, “un alimento funcional es aquel que contiene un componente, nutriente o no nutriente, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor

nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable” (ILSI, 1999).

Según esta definición, los tres requisitos básicos de un alimento para que pueda ser considerado funcional incluye 1) derivar de ingredientes naturales que sea; 2) consumido como parte de la dieta diaria; y 3) ayuda a regular procesos específicos para el ser humano, inclusive retrasar el envejecimiento, previniendo el riesgo de enfermedades y mejorando la capacidad inmunológica (Jimenez-Colmenero y col., 2001).

En una definición más actual de Palou y col. (2003), “un alimento puede considerarse funcional si como tal se ha demostrado suficientemente que afecta beneficiosamente (más allá de proporcionar nutrición adecuada desde el punto de vista tradicional) a una o varias funciones relevantes del organismo, de manera que proporciona un mejor estado de salud y bienestar y/o reduce el riesgo de padecer una enfermedad”. Esta definición resalta todavía más que la anterior la relación entre la funcionalidad de un alimento y la salud, resaltando que pueden reducir el riesgo de padecer enfermedades.

La principal diferencia entre los alimentos funcionales y otros productos que incorporan principios activos, concentrados, extractos, etc. (“nutracéuticos”) es su presentación comercial, ya que en los funcionales, es siempre en forma de alimento convencional y no como medicamento. Los alimentos funcionales son, por lo tanto, alimentos de verdad (no se trata de cápsulas ni de comprimidos), son elementos que forman parte de una dieta a los cuales se les reconoce un efecto potencialmente beneficioso para el bienestar de los individuos y para su salud (Pascal., 1996). De este modo, los alimentos funcionales están destinados a todos los consumidores sanos que sólo desean favorecer su salud.

Según el ILSI-Europe, un alimento funcional puede ser:

- Un alimento natural
- Un alimento al que se le ha agregado un componente.
- Un alimento al que se le ha eliminado un componente.

- Un alimento en el que la naturaleza de uno o más de sus componentes ha sido modificada.
- Un alimento en el que la biodisponibilidad de uno o más de sus componentes ha sido modificada
- Cualquier combinación de las posibilidades anteriores.

Los alimentos funcionales se han desarrollado en casi todas las categorías alimentarias, pero los segmentos en que más presencia tiene son los productos lácteos, las bebidas refrescantes, los zumos, los productos de pastelería y los de la alimentación infantil (Lamarche, 2008). Actualmente, también se está haciendo un gran esfuerzo por parte de la industria cárnica para poner en el mercado una amplia variedad de preparados de carne y productos cárnicos con propiedades funcionales que ayuden a mejorar la negativa imagen que se tiene desde el punto de vista nutricional las carnes y productos cárnicos (Jiménez Colmenero, 2007).

### *1.2.2. Legislación relativa a los alimentos funcionales*

El auge de los alimentos funcionales hizo necesario establecer legal y científicamente las bases en las que se apoyan las alegaciones funcionales de los productos alimenticios comercializados, y demostrar sus efectos en las cantidades que normalmente se consumirían en el contexto de una dieta global. Como respuesta a esta necesidad, el 30 de diciembre de 2006 la Comisión Europea aprobó el Reglamento (CE) N°. 1924/2006 del parlamento europeo y del consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Este reglamento afecta a todas las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables efectuadas en las comunicaciones comerciales, incluidas campañas publicitarias y de promoción.

Con respecto a la información dirigida al consumidor que se puede acompañar a estos alimentos, las declaraciones utilizadas en el etiquetado pueden ser de diferente índole:

- Declaraciones con respecto a la composición nutricional.

- Declaraciones que indican la función nutricional de algún componente.
- Declaraciones sobre componentes que incrementen o acentúen una función fisiológica.
- Declaraciones que indican el papel que un nutriente o un componente puede jugar en la reducción de un factor de riesgo para una enfermedad humana (Urrialde, 2006)

Los artículos 5 y 6 del Reglamento (CE) 1924/2006 hacen hincapié en que, para garantizar la veracidad de las declaraciones es necesario que la sustancia objeto de la declaración esté presente en el producto final en cantidades que sean suficientes, o que la sustancia esté ausente o presente en las cantidades reducidas adecuadas, para producir el efecto nutricional o fisiológico declarado. Esta sustancia debe ser asimilable por el organismo. Además, una cantidad de alimento que sea razonable esperar que se consuma debe proporcionar una cantidad significativa de la sustancia que produce el efecto declarado. Todas estas declaraciones deben basarse en datos científicos generalmente aceptados, y harán referencia a los alimentos listos para su consumo de conformidad con las instrucciones del fabricante. En el anexo de este reglamento se establece una lista de declaraciones nutricionales y las condiciones que se les aplican. Estas declaraciones son las siguientes:

**Bajo valor energético:** podrá declararse que un alimento posee un bajo valor energético, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto no contiene más de 40 kcal (170 kJ)/100 g en el caso de los sólidos o más de 20 kcal (80 kJ)/100 ml en el caso de los líquidos. Para los edulcorantes de mesa se aplicará un límite de 4 kcal (17 kJ) por porción, con propiedades edulcorantes equivalentes a 6 g de sacarosa (una cucharadita de sacarosa aproximadamente).

**Valor energético reducido:** podrá declararse que un alimento posee un valor energético reducido, si su valor energético se reduce, como mínimo, en un 30 %, con una indicación de la característica o características que provocan la reducción del valor energético total del alimento.

**Sin aporte energético:** podrá declararse que un alimento carece de aporte energético, si el producto no contiene más de 4 kcal (17 kJ)/100 ml. Para los edulcorantes de mesa se aplicará un límite de 0,4 kcal (1,7 kJ) por porción, con propiedades edulcorantes equivalentes a 6 g de sacarosa (una cucharadita de sacarosa aproximadamente).

**Bajo contenido de grasa:** sólo se podrá hacer esta alegación si el producto no contiene más de 3 g de grasa por 100 g (1,5 g de grasa por 100 ml para el caso de líquidos).

**Sin grasa:** podrá declararse que un alimento no contiene grasa, si el producto no contiene más de 0,5 g de grasa por 100 g o 100 ml. No obstante, se prohibirán las declaraciones expresadas como «X % sin grasa».

**Bajo contenido en grasas saturadas:** solamente podrá declararse que un alimento posee un bajo contenido de grasas saturadas si la suma de ácidos grasos saturados y de AGt en el producto no es superior a 1,5 g por 100 g o 0,75 g por 100 ml para los productos líquidos. En cualquier caso esta suma no deberá suponer más del 10 % del valor energético.

**Sin grasas saturadas:** podrá declararse que un alimento no contiene grasas saturadas, si la suma de grasas saturadas y de AGt no es superior a 0,1 g por 100 g o 100 ml.

**Bajo contenido en azúcares:** podrá declararse que un alimento posee un bajo contenido de azúcares, si el producto no contiene más de 5 g de azúcares por 100 g en el caso de los sólidos o 2,5 g de azúcares por 100 ml en el caso de los líquidos.

**Sin azúcares:** podrá declararse que un alimento no contiene azúcares, si el producto no contiene más de 0,5 g de azúcares por 100 g o 100 ml.

**Sin azúcares añadidos:** podrá declararse que no se han añadido azúcares a un alimento, si no se ha añadido al producto ningún monosacárido ni disacárido, ni ningún alimento utilizado por sus propiedades edulcorantes. Si los azúcares están naturalmente presentes en los alimentos, en el etiquetado deberá figurar asimismo la siguiente indicación: «CONTIENE AZÚCARES NATURALMENTE PRESENTES».

**Bajo contenido en sodio/sal:** podrá alegarse que un alimento tiene bajo contenido en sodio si el producto no contiene más de 0,12 g de sodio o el valor equivalente de sal, por 100 g o por 100 ml.

**Muy bajo contenido de sodio/sal:** podrá declararse que un alimento posee un contenido muy bajo de sodio/sal, si el producto no contiene más de 0,04 g de sodio, o el valor equivalente de sal, por 100 g o por 100 ml.

**Sin sodio o Sin sal:** podrá declararse que un alimento no contiene sodio o sal, si el producto no contiene más de 0,005 g de sodio, o el valor equivalente de sal, por 100 g.

**Fuente de fibra:** esta alegación puede realizarse si el producto contiene como mínimo 3 g de fibra por 100 g o 1,5 g de fibra por 100 Kcal.

**Alto contenido de fibra:** podrá declararse que un alimento posee un alto contenido de fibra, si el producto contiene como mínimo 6 g de fibra por 100 g o 3 g de fibra por 100 kcal.

**Fuente de proteínas:** podrá declararse que un alimento es fuente de proteínas, si las proteínas aportan como mínimo el 12 % del valor energético del alimento.

**Alto contenido de proteínas:** podrá declararse que un alimento posee un alto contenido de proteínas, si las proteínas aportan como mínimo el 20 % del valor energético del alimento.

**Fuente de vitaminas y/o minerales:** podrá declararse que un alimento es una fuente de vitaminas y/o minerales, si el producto contiene como mínimo una cantidad significativa tal como se define en el Anexo de la Directiva 90/496/CEE o una cantidad establecida por las excepciones concedidas en virtud del artículo 6 del Reglamento (CE) 1925/2006 [sobre la adición de vitaminas, minerales y otras determinadas sustancias a los alimentos].

**Alto contenido de vitaminas y/o minerales:** podrá declararse que un alimento posee un alto contenido de vitaminas y/o minerales, si el producto contiene como

mínimo dos veces el valor de la «fuente de [NOMBRE DE LAS VITAMINAS] y/o [NOMBRE DE LOS MINERALES]».

**Contiene....:** podrá declararse que un alimento contiene un nutriente u otra sustancia, para los que no se establezcan condiciones específicas en el Reglamento 1924/2006, si el producto cumple todas las disposiciones aplicables previstas en el Reglamento 1924/2006, y en particular en el artículo 5. Por lo que respecta a las vitaminas y minerales, se aplicarán las condiciones correspondientes a la declaración «fuente de».

**Mayor contenido de...:** podrá declararse que se ha incrementado el contenido de uno o más nutrientes, distintos de vitaminas o minerales, así como efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto cumple las condiciones previstas para la declaración «fuente de» y el incremento de su contenido es de, como mínimo, el 30 % en comparación con un producto similar.

**Contenido reducido de...:** podrá declararse que se ha reducido el contenido de uno o más nutrientes, si la reducción del contenido es de, como mínimo, el 30 % en comparación con un producto similar, excepto para micronutrientes, en los que será admisible una diferencia del 10 % en los valores de referencia establecidos en la Directiva 90/496/CEE, así como para el sodio, o el valor equivalente para la sal, en que será admisible una diferencia del 25 %.

**Light/Lite/Ligero:** las declaraciones en las que se afirme que un producto es «*light*» o «*lite*» (ligero), y cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, deberán cumplir las mismas condiciones que las establecidas para el término «contenido reducido»; asimismo, la declaración deberá estar acompañada por una indicación de la característica o características que hacen que el alimento sea «*light*» o «*lite*» (ligero).

**Naturalmente/Natural:** cuando un alimento reúna de forma natural la condición o las condiciones establecidas en el presente Anexo para el uso de una declaración nutricional, podrá utilizarse el término «naturalmente/natural» antepuesto a la declaración.

Finalmente, el Reglamento (CE) nº 1925/2006, de 20 de diciembre de 2006 regula la adición de vitaminas, minerales y otras determinadas sustancias a los alimentos. En virtud de este reglamento se fijan en el anexo de la Directiva 90/496/CEE las cantidades mínimas significativas de vitaminas o minerales que deben estar presentes en un alimento para declararlo “fuente de...”. Fijándose este valor en una dosis equivalente al 15 % de la CDR (cantidad diaria recomendada) para cada una de las vitaminas y minerales.

El Reglamento (CE) 1924/2006 se ha modificado recientemente en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales, por el Reglamento (CE) 116/2010 de la Comisión, de 9 de febrero de 2010. Esta modificación afecta al uso de las declaraciones nutricionales en relación con los ácidos grasos *n*-3, las grasas monoinsaturadas, las grasas poliinsaturadas y las grasas insaturadas. Según esta reciente modificación se establecen las siguientes condiciones para la utilización de declaraciones nutricionales que se refieran a esos elementos:

**Fuente de ácidos grasos omega-3:** podrá declararse que un alimento es fuente de ácidos grasos omega-3 o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene al menos 0,3 g de ácido  $\alpha$ -linolénico (ALA) por 100 g y por 100 kcal, o al menos 40 mg de la suma de EPA y DHA por 100 g y por 100 kcal.

**Alto contenido de ácidos grasos omega-3:** podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de ácidos grasos omega-3 o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si el producto contiene al menos 0,6 g de ácido ALA por 100 g y por 100 kcal, o al menos 80 mg de la suma de EPA y DHA por 100 g y por 100 kcal.

**Alto contenido de grasas monoinsaturadas:** podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas monoinsaturadas o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas monoinsaturadas y las grasas monoinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

**Alto contenido de grasas poliinsaturadas:** podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas poliinsaturadas o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si al menos un 45 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas poliinsaturadas y las grasas poliinsaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

**Alto contenido de grasas insaturadas:** podrá declararse que un alimento tiene un alto contenido de grasas insaturadas o efectuarse cualquier otra declaración que pueda tener el mismo significado para el consumidor, si al menos un 70 % de los ácidos grasos presentes en el producto proceden de grasas insaturadas y las grasas insaturadas aportan más del 20 % del valor energético del producto.

### *1.2.3. Estrategias para el diseño de alimentos funcionales*

En la actualidad se trabaja en tres frentes diferentes para obtener alimentos funcionales de origen animal. Actuación sobre el genoma; sobre la alimentación animal y/o sobre el proceso de elaboración del producto (Sánchez-Muñiz, 2005). Los principales pasos a seguir en el diseño de alimentos funcionales son los siguientes:

1. Selección de innovaciones prioritarias en forma de adición y/o supresión de ingredientes funcionales o componentes del alimento.
2. Formulación cualitativa/cuantitativa preliminar del alimento funcional, teniendo en cuenta las características deseadas.
3. Indagación sobre los efectos beneficiosos deseados, dosis recomendables, biodisponibilidad, sobredosis de seguridad y sistemas de aplicación apropiado al alimento y compatibilidad de los ingredientes con el alimento.
4. Evaluación organoléptica preliminar del alimento diseñado, para determinar el grado de aceptabilidad. En caso de ser necesario, hacer los ajustes pertinentes, utilizando colorantes, texturizantes o sustancias que enmascaran olores/sabores sin alterar la composición.
5. En caso de evaluación organoléptica positiva, realización del diseño a escala laboratorial del alimento funcional.
6. Estudio de la estabilidad de los componentes funcionales del alimento, en las condiciones normales de almacenamiento y consumo.

7. Estudio de la vida media útil del alimento funcional, para comprobar el tipo y nivel de degradación previsible o modificación de sus caracteres organolépticos en relación al producto base.
8. Planificación de un ensayo industrial confirmativo.
9. Análisis del contenido de ingredientes funcionales en el alimento y evaluación analítica periódica para comprobar la posible degradación de los mismos a lo largo de su vida útil.
10. Finalmente, la validación definitiva del diseño, comprobando la conformidad del alimento funcional a nivel organoléptico, físico-químico, microbiológico, de comportamiento (estabilidad y durabilidad) y de cumplimiento industrial (Gavilán, 2007).

### **1.3. Clasificación y estructura de los lípidos**

Los lípidos son un grupo de sustancias diversas de naturaleza compleja, que se encuentran en los tejidos vegetales y animales y están formados básicamente por carbono, hidrógeno y, en menor proporción, oxígeno; aunque en ocasiones también pueden contener fósforo, azufre y nitrógeno. Estas sustancias comparten dos características, ser insolubles en agua y solubles en disolventes orgánicos. Por ser un grupo de sustancias tan heterogéneo su clasificación (Tabla 1) es complicada, realizándose esta en base a criterios empíricos, basándose en si son saponificables; es decir, si forman jabones al reaccionar con sosa o potasa, o insaponificables; cuando no poseen dicha propiedad. (De Blas y col., 1987). Los lípidos saponificables contienen ácidos grasos en su estructura, mientras que los insaponificables no.

**Tabla 1. Clasificación de los lípidos**

<b>Saponificables</b>	<b>Simple</b>	Ácidos grasos Glicéridos Ceras	Solamente poseen carbono, hidrógeno y oxígeno.
	<b>Complejos</b>	Fosfoglicéridos Esfingolípidos Glicolípidos	Estructura similar a las grasas, pero contienen fósforo y nitrógeno.
<b>Insaponificables</b>	Esteroides Terpenos Prostaglandinas		

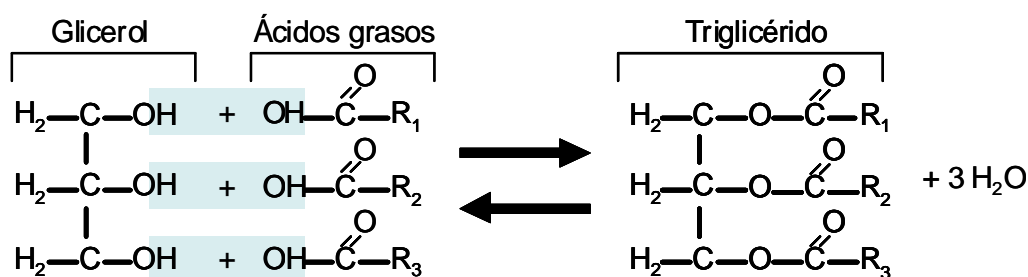
Los lípidos, cumplen las siguientes funciones en el organismo:

- 1.- Función de reserva energética, almacenándose en forma de triacilgliceroles.
- 2.- Función estructural, formando las bicapas lipídicas que componen las membranas biológicas, en forma de fosfolípidos.
- 3.- Función de señalización celular, participando en la transmisión de señales bajo la forma de mensajeros intracelulares hormonas esteroideas, fosfatidilinositol, eicosanoides y derivados de la esfingosina.
- 4.- Función transportadora desde donde son absorbidos (intestino) o producidos (hígado) hasta sus destinos, asociándose a apolipoproteínas en forma de lipoproteínas.

La mayoría de los lípidos de reserva están en forma de triglicéridos, en más de un 95 %, que son los lípidos más abundantes. Además, los lípidos de reserva de energía son los predominantes en los animales, son los lípidos que se encuentran en forma de grasa que puede llegar a constituir el 97% del tejido adiposo en un animal obeso. Los lípidos estructurales (principalmente fosfoglicéridos) constituyen entre el 0,5 y 1% del tejido muscular y adiposo.

### 1.3.1. Los triglicéridos

Las grasas o glicéridos son ésteres de ácidos grasos con el alcohol trihídrico 1,2,3-propanotriol (glicerol). Cuando los tres grupos alcohol se esterifican con ácidos grasos se habla de triglicéridos (triacilgliceroles). Aunque los triglicéridos son los más abundantes, los mono y diglicéridos también pueden aparecer de forma natural, pero en menores cantidades. Estos glicéridos se forman en una reacción de esterificación donde el grupo funcional carboxilo de cada ácido graso se une a un grupo funcional alcohol mediante un enlace covalente de tipo éster, desprendiéndose una molécula de agua (Figura 3).

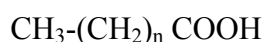


**Figura 3. Formación y estructura básica de los triglicéridos. Los radicales (R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub> y R<sub>3</sub>) consisten en una cadena hidrocarbonada de longitud y saturación variable.**

Los triglicéridos constituyen la principal forma de almacenamiento de energía, en alimentos de origen animal y vegetal, así como en el organismo humano. En cantidades elevadas son perjudiciales, ya que pueden producir depósitos de grasa. Se clasifican en diferentes tipos según la naturaleza y la situación de los ácidos grasos que los forman. Si los tres ácidos grasos son los mismos se llaman triglicéridos simples, y si son diferentes se habla de triglicéridos mixtos. Las grasas y aceites naturales son mezclas de triglicéridos mixtos. Dependiendo del tipo de ácido graso mayoritario presente en las grasas éstas se pueden clasificar como: saturadas (con presencia mayoritaria de AGS), monoinsaturadas (si la mayor parte de los ácidos grasos son monoinsaturados) y poliinsaturadas (si la mayor parte de los ácidos grasos que las forman son poliinsaturados). La composición de ácidos grasos de los triglicéridos determina sus características físicas.

### 1.3.2. Los ácidos grasos

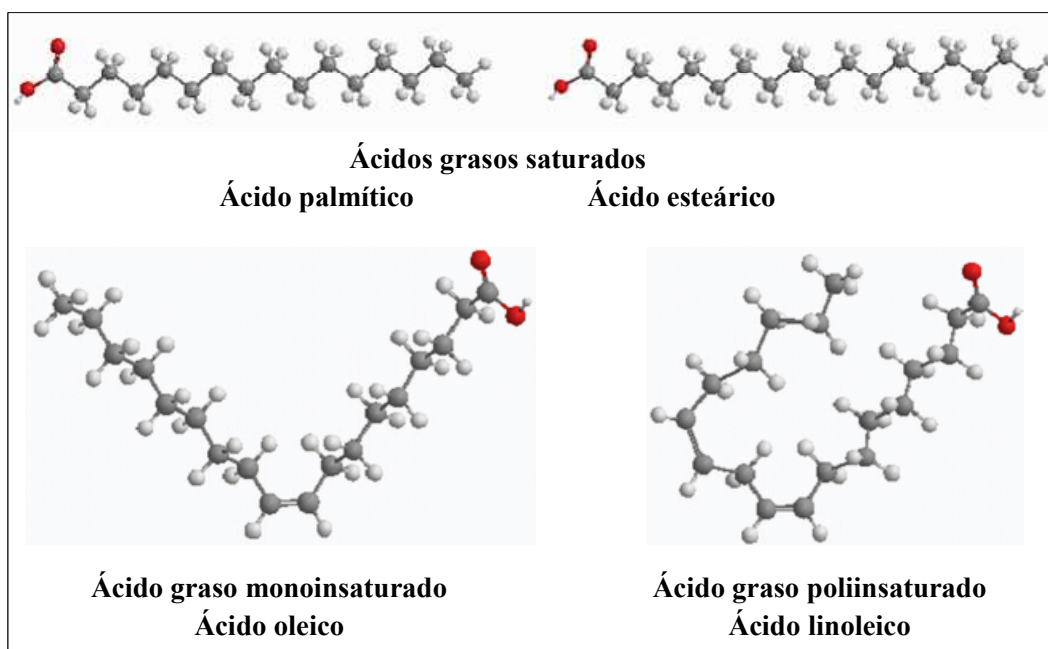
Los ácidos grasos son las moléculas lipídicas con mayor interés nutricional. Forman parte de los triglicéridos y de los lípidos complejos, y también pueden esterificar al colesterol. Están constituidos por una cadena hidrocarbonada de mayor o menor longitud, con un grupo carboxilo en un extremo (HOOC-) y un grupo metilo (H<sub>3</sub>C-) en el otro, cuya fórmula es la siguiente:



Donde *n* representa el número de átomos de carbono de que está compuesto el ácido graso. Este número será al menos dos, para formar el ácido butírico, que es el ácido graso de cadena más corta.

Los ácidos grasos de interés biológico poseen un número par de átomos de carbono (fundamentalmente entre 4 y 26) y se clasifican en cuatro grupos atendiendo a la longitud de su cadena hidrocarbonada. Así los ácidos grasos de cadena corta tienen entre 4 y 6 átomos de carbono; los ácidos grasos de cadena media presentan entre 8 y 12; los ácidos grasos de cadena larga poseen entre 14 y 18; y finalmente, los ácidos grasos de cadena muy larga son aquellos que presentan 20 o más átomos de carbono en su cadena hidrocarbonada (Mataix, 2002).

Los ácidos grasos se clasifican también según la saturación de su cadena hidrocarbonada (Figura 4). Según esto, existen básicamente dos tipos de ácidos grasos, los saturados y los insaturados, estos últimos se clasifican atendiendo al número de insaturaciones que presenten. Los AGS por su parte, presentan estructuras lineales con un número par de átomos de carbono unidos todos ellos por enlaces simples. Los AGMI contienen un doble enlace, como el ácido oleico (*cis*18:1 $n$ -9). Finalmente, los AGPI, son aquellos que contienen más de un doble enlace y se clasifican en función de la posición del último doble enlace respecto al grupo metilo terminal. En función de esta clasificación destacan dos familias de AGPI los *n*-6 y los *n*-3.



**Figura 4. Estructura de los ácidos grasos según el número de insaturaciones**

En los ácidos grasos que poseen dobles enlaces, la conformación de los mismos suele ser de tipo *cis*. Aunque también existen de forma natural, minoritariamente, hay ácidos grasos con dobles enlaces con conformación *trans*, presentes de forma natural en la grasa de la leche y de la carne de los rumiantes, pueden originarse también debido a transformaciones químicas de los ácidos grasos naturales durante diversos procesos tecnológicos como la hidrogenación. Los ácidos grasos con dobles enlaces *trans* son rectos, como los saturados, a diferencia de los que poseen dobles enlaces *cis* dan como resultado moléculas angulares. Por lo cual, los AGt no pueden sustituir nutricionalmente a los *cis*, porque aunque proporcionan la misma cantidad de energía, no tienen las mismas propiedades biológicas que sus homólogos *cis*.

Además de su configuración, hay que destacar, que los dobles enlaces de los ácidos grasos poliinsaturados más abundantes suelen situarse de forma que siempre aparezca un grupo metileno entre dos dobles enlaces, es decir, los siguientes se sitúan a una distancia de tres carbonos en dirección al extremo carboxilo. Gracias a este hecho, los AGPI más comunes pueden ser descritos indicando simplemente, el número de dobles enlaces y la posición del doble enlace más cercano al grupo terminal metilo, mientras que el resto de las posiciones de los dobles enlaces pueden ser deducidos (Wallis y col., 2002).

Sin embargo, existen casos de ácidos grasos naturales con dobles enlaces conjugados, como es el caso de los del ácido linoleico conjugado (CLA). Este CLA (Figura 5) representa a una mezcla de 28 isómeros posicionales y geométricos del ácido linoleico caracterizados por tener dobles enlaces conjugados, en lugar de estar separados por un grupo metileno (Steinhart y col., 2003). Estos dobles enlaces, pueden presentarse en forma de distintos isómeros posicionales, situándose en las posiciones 8 y 10, 9 y 11, 10 y 12, 11 y 13; y presentando también distintas configuraciones (isómeros geométricos *cis, cis*; *cis, trans*; *trans, cis*; y *trans, trans*) y suelen estar situados en las (Wahle y col., 2004).

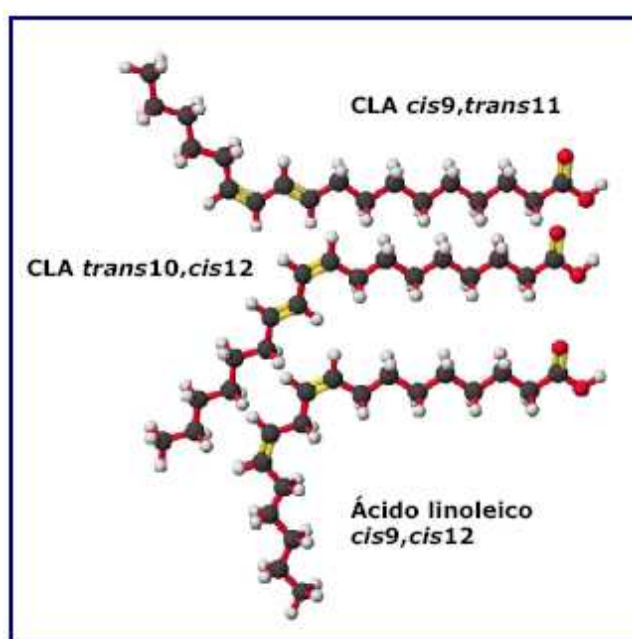


Figura 5. Estructura de diversos isómeros de ácido linoleico conjugado

En la nomenclatura abreviada para los ácidos grasos, un primer número indica el número de átomos de carbono, un segundo número, tras dos puntos, indica el número de dobles enlaces, finalmente la letra n seguida de un número, y separada de este por un guión, indica la posición del primer doble enlace contando a partir del grupo metilo del ácido graso, al que se denomina extremo omega.

### 1.3.3. Otros lípidos

Los llamados lípidos complejos, glicerofosfolípidos (fosfolípidos) y esfingolípidos, contienen en su estructura otros átomos además de carbono, hidrógeno y

oxígeno. Estos lípidos junto con el colesterol son los lípidos que constituyen las membranas celulares. Los fosfolípidos están formados por una molécula de glicerol, esterificada con dos cadenas de ácidos grasos (en el C1 y C2) que pueden ser o no iguales y un grupo fosfato (en el C3) unido a una cabeza polar. Tienen funciones estructurales estando presentes a ambos lados en la bicapa lipídica. Los esfingolípidos constan de la esfingosina unida a un ácido graso mediante un enlace covalente amida (ceramida), la cual a su vez se une a un grupo fosfato y este a una cabeza polar. Estos últimos lípidos forman subdominios o “rafts” junto con el colesterol en la monocapa lipídica exoplasmática, compartimentalizando procesos celulares y modulando la actividad de las membranas biológicas.

Ácidos grasos presentes en alguna clase de glicerofosfolípido (p.e. fosfatidilinositolídeos) dan origen a compuestos de gran actividad biológica como son los eicosanoides (derivados de ácidos grasos de 20 átomos de carbono de las series *n*-6 y *n*-3, con propiedades pro- y antiinflamatorias, entre otras). A pesar de su gran importancia biológica estos lípidos tienen poca importancia desde el punto de vista nutricional, puesto que deben su interés nutricional a los ácidos grasos que los componen y se encuentran en muy poca cantidad en los alimentos en relación con los triglicéridos.

El colesterol (Figura 6) es también un lípido de gran interés biológico, ya que tiene una papel estructural: formando parte de las membranas celulares y un papel funcional: como precursor de hormonas esteroideas, ácidos biliares y de la vitamina D. El colesterol ha despertado gran interés en los últimos años porque su exceso se relaciona con enfermedades coronarias y cáncer. De hecho, los valores de colesterol total, colesterol esterificado en LDLs (“colesterol malo”), colesterol esterificado en HDLs (“colesterol bueno”) y relación colesterol LDL/HDL se utilizan como marcadores del riesgo cardiovascular.

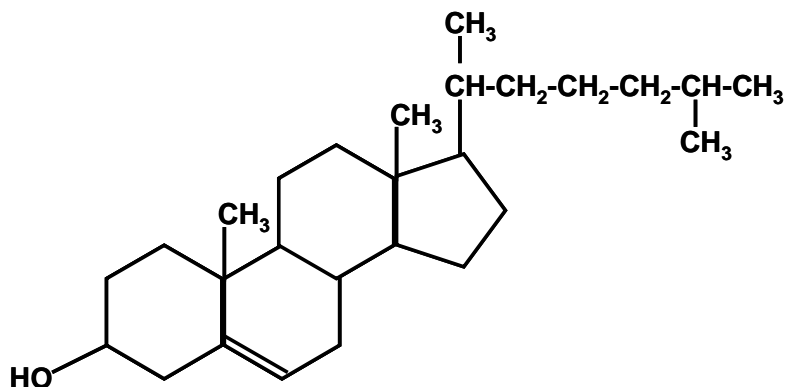


Figura 6. Fórmula del colesterol

## 1.4. Los lípidos desde el punto de vista nutricional

En alimentación, siempre se intenta asegurar que la dieta contenga cantidades adecuadas de energía y nutrientes esenciales. Hasta la fecha se han identificado más de 30 nutrientes esenciales necesarios para que la dieta sea adecuada. Los nutrientes esenciales están incluidos en seis grandes grupos de elementos que deben tener los alimentos: agua, energía (carbohidratos y grasas), proteínas y aminoácidos, ácidos grasos esenciales, vitaminas, minerales. La fibra, aunque no es esencial, sí es necesaria para aumentar la viscosidad del bolo alimenticio y el tiempo de tránsito gástrico (fibra soluble) y disminuye el tiempo de vaciado intestinal (fibra insoluble como el salvado de trigo).

Las grasas son los componentes nutricionales que principalmente aportan energía a nuestro organismo, siendo la fuente de energía más concentrada. Ya que 1 g de grasa aporta 9 Kcal, mientras 1 g del resto de los principios inmediatos con propiedades energéticas (sean hidratos de carbono o proteínas) proporciona 4 Kcal. Además las grasas también intervienen en otros procesos fisiológicos, como servir de vehículo a las vitaminas liposolubles, formar parte de las estructuras celulares, ser fuente de ácidos grasos esenciales y regular los niveles de lípidos sanguíneos. Por este motivo, no debemos olvidar que la grasa, especialmente algunos ácidos grasos concretos, son nutrientes esenciales y por lo tanto, imprescindibles para la vida (Gil, 2010).

Sin embargo, según el tipo y la cantidad de grasa que consumamos, las grasas pueden ser aliados o enemigos de la salud. El excesivo consumo de grasa, debido a su gran aporte energético, se relaciona con la gran prevalencia en las sociedades occidentales del sobrepeso y la obesidad, la gran epidemia nutricional del siglo XXI (Mataix y col., 2001). Ya que asociadas a la obesidad aparecen enfermedades como las cardiovasculares y algunos tipos de cáncer. En nuestro país, por ejemplo, las enfermedades cardiovasculares, tradicionalmente relacionadas con un consumo excesivo consumo de grasa, ocupan el primer lugar entre las causas de muerte (Figura 7).

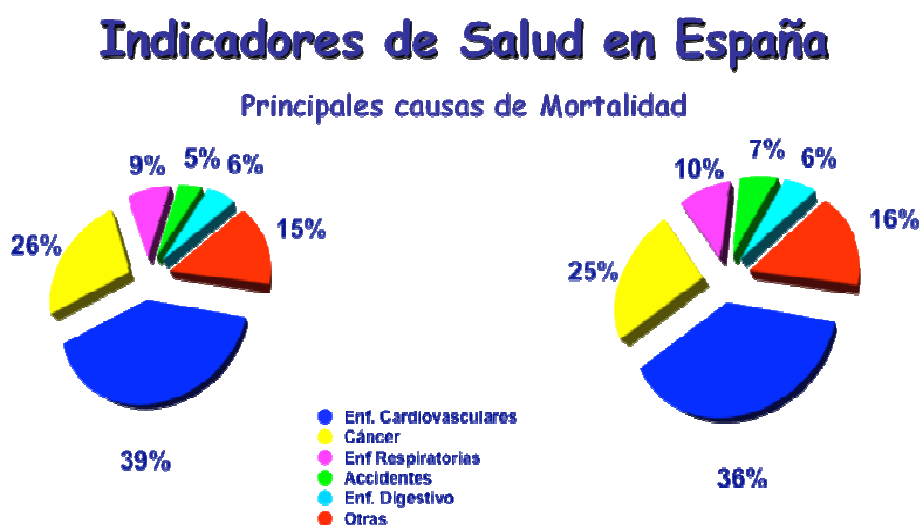


Figura 7. Principales causas de muerte en España. Fuente: AESAN.

#### 1.4.1. Fuentes de los ácidos grasos más importantes desde el punto de vista nutricional.

Los tejidos animales aportan grasas y aceites con una composición rica en AGS (principalmente esteárico) y AGMI, pero muy pequeñas cantidades de AGPI.

El ácido oleico (*cis*18:1*n*-9), principal representante de los ácidos grasos monoinsaturados y de la serie omega-9 (*n*-9), está presente en todas las grasas y aceites vegetales, especialmente en el aceite de oliva.

El ácido linoleico (18:2 $n$ -6) es el ácido graso poliinsaturado más abundante y el principal representante de la serie  $n$ -6, mayoritario en los aceites vegetales de maíz, girasol y soja.

Existen dos tipos de ácidos grasos de la serie  $n$ -3, los procedentes del medio marinos (pescado y moluscos) y los de origen vegetal. El ácido ALA(18:3 $n$ -3) es el más abundante en la dieta del ser humano, se encuentra fundamentalmente en los aceites de origen vegetal y en los frutos secos, siendo el lino y por lo tanto el aceite de linaza la fuente más rica de este ácido graso (57% de los ácidos grasos totales), fuentes destacables son también el aceite de colza, la soja, el germen de trigo y las nueces. La carne de origen animal, particularmente la de rumiantes, y los productos lácteos también proporcionan ALA. Sin embargo, las técnicas agrícolas modernas han originado un descenso en el contenido de ácidos grasos  $n$ -3 de la carne (especialmente cordero y ternera) debido al uso casi generalizado de concentrados de cereales ricos en ácidos grasos  $n$ -6 para alimentar al ganado (Trautwein, 2001) En cuanto a los ácidos grasos  $n$ -3 de cadena más larga, como el EPA ( 20:5 $n$ -3), el ácido DHA ( 22:6 $n$ -3) y otro menos investigado como es el ácido docosapentaenoico (DPA, 22:5 $n$ -3), las fuentes más ricas son los aceites de pescado y el pescado azul, también abundan en pescados blancos, mariscos, algas y microalgas. Así, el DPA es muy común en aceite de foca y en la carne de animales de pasto (Mann y col., 2010).

#### *1.4.2. Recomendaciones dietéticas para el consumo de lípidos.*

En primer lugar debe ajustarse el aporte calórico de la dieta a las necesidades de cada persona, porque el exceso se acumula en forma de grasa y provoca obesidad. Para lo cual hay que tener en cuenta que las grasas aportan mayor cantidad de energía.

La Organización Mundial de la Salud ha establecido diversas recomendaciones para prevenir enfermedades crónicas relacionadas con la dieta. De este modo, la grasa debería proporcionar entre el 15 y el 30 % de las calorías de la dieta. Además, actualmente, existen recomendaciones dietéticas específicas para cada grupo de ácidos grasos, dado que los efectos beneficiosos (o potencialmente perjudiciales) que éstos pueden aportar al organismo, varían en función del grupo de ácidos grasos del que estemos hablando (AESAN; 2005; Mataix y col., 2001). Los ácidos grasos saturados (AGS) aumentan las concentraciones plasmáticas de colesterol total y colesterol-LDL,

por lo tanto no deberían superar el 10 % de las calorías totales de la dieta. Por otro lado, las calorías no deben proceder en más del 10 % de AGPI, (*n*-6, 5-8 %; *n*-3, 1-2 %), en torno al 10-15 % de AGMI, principalmente ácido oleico y menos del 1% de AGt (WHO, 2003). Además, la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria recomienda que el ácido graso mayoritario en la dieta debe ser el oleico, debiendo representar la mitad o más de la grasa ingerida y el consumo de AGPI, especialmente los de la serie *n*-6 debe limitarse a un máximo de un 5 % de la energía total de la dieta, correspondiendo la mayor parte al ácido linoleico (SENC, Mataix y Col., 2001). Entre los objetivos nutricionales para la población española, se recoge que la fracción (AGPI+AGMI)/AGS debe ser superior o igual a 2 y la AGPI/AGS superior o igual a 0,5 (Moreiras y col, 2006). Además, en la actualidad se hace un mayor hincapié en lograr un correcto equilibrio entre las distintas familias de ácidos grasos insaturados, especialmente los pertenecientes a las series *n*-3, *n*-6 y *n*-9.

Para conocer el potencial para causar problemas cardiovasculares, Ulbricht y Southgate (1991) fijaron un índice al que denominaron índice de aterogenicidad (Figura 8), el cual se define como la razón del contenido de los ácidos grasos capaces de aumentar los niveles de colesterol sérico (ácidos láurico, mirístico y palmítico) y los ácidos grasos de acción protectora (mono y poliinsaturados). Este índice es hoy en día muy utilizado por los profesionales de la medicina y la nutrición.

$$\text{Índice de Aterogenicidad} = \frac{\text{ácido láurico} + 4(\text{ácido mirístico}) + \text{ácido palmítico}}{\text{poliinsaturados omega - 3} + \text{poliinsaturados omega - 6} + \text{oléico} + \text{otros monoinsaturados}}$$

**Figura 8. Fórmula de índice de aterogenicidad propuesto por Ulbricht y Southgate (1991).**

Debido a los efectos beneficiosos de los *n*-3 se han llevado a cabo numerosos estudios para determinar su Ingesta Diaria Recomendada. Basándose en esos estudios, la Asociación Internacional para el estudio de los ácidos grasos y de los lípidos ISSFAL ha recomendado que la ingesta diaria de EPA y DHA debe ser de 650 mg/día con un mínimo de 100 mg/día (Gil, 2004). Por otro lado, la Asociación Americana del Corazón recomienda, para el caso de pacientes con enfermedad cardíaca coronaria, el consumo de 1 g/día de EPA + DHA (Kris-Etherton y col., 2002). Mientras que para el caso de

mujeres en periodo de lactación, para asegurar un contenido óptimo de  $n-3$  en la leche materna, la madre debería ingerir alrededor de 650 mg/día de  $n-3$  (Mataix y Gil, 2004).

En la bibliografía científica se encuentran también referencias de ensayos clínicos sobre el equilibrio  $n-6/n-3$  de la dieta, realizados con el objetivo de establecer los valores recomendados de dicha relación. Así en la dieta occidental la relación  $n-6/n-3$ , esta desequilibrada alcanzando valores de 15 -18/1, ratios de 5/1 se asocian con mejoras en enfermos con asma, valores de 4/1 reducen un 70% el riesgo de mortalidad por enfermedades cardiovasculares, relaciones de 2-3/1 suprimen inflamaciones en enfermos con artritis reumatoide. Un menor riesgo de padecer cáncer se asocia a mejores balances  $n-6/n-3$ . De hecho, el riesgo de cáncer de mama baja cuando esta relación es menor de 3/1 y pacientes con cáncer colorrectal mejoran con ratios 2,5/1 (Simopoulos, 2008).

En términos generales, se puede concluir que una relación  $n-6/n-3$  de 4:1 o inferior tiene efectos saludables (Wood y col., 2008). Un mayor exceso de  $n-6$  sobre  $n-3$  desplaza el equilibrio redox celular y provoca alteraciones en la expresión de importantes proteínas reguladoras y, como consecuencia, desórdenes en los procesos modulados por las mismas, que contribuyen al desencadenamiento de enfermedades tumorales, cardiovasculares, inflamatorias, autoinmunes y neurodegenerativas. Por tanto, el equilibrio  $n-6/n-3$  debe contribuir a la prevención de dichas enfermedades (Palanca, 2006). En la población española esta relación  $n-6/n-3$  está muy descompensada, ya que se ingiere el 50 % de la cantidad diaria recomendada de  $n-3$ , y el consumo de  $n-6$  está muy por encima del recomendado (Mataix, 2002).

Para el caso del CLA, existe actualmente cierto consenso en que es recomendable una ingesta diaria de estos isómeros en torno a 3 g/día, y que no es recomendable una dosis mayor de 7,2 g/día (Gaulhier y col., 2002).

Además de las anteriores recomendaciones, habría que limitar la ingestión de colesterol a menos de 300 mg/día, puesto que el principal factor de riesgo de las enfermedades cardiovasculares es un nivel de colesterol sanguíneo elevado. Lo cual se produce como consecuencia de tres factores principales, a un alto contenido en grasa de la dieta, una elevada proporción de grasas saturadas y también a una elevada ingesta de colesterol. Por el contrario, los ácidos grasos poliinsaturados reducen el nivel de

colesterol sanguíneo. Mientras que los ácidos grasos monoinsaturados no modifican los niveles de colesterol sanguíneo, pero sí elevan la proporción de lipoproteínas HDL, que son las lipoproteínas encargadas de reenviar el exceso de colesterol acumulado en tejidos extrahepáticos al hígado para su transformación en sales biliares (transporte reverso del colesterol).

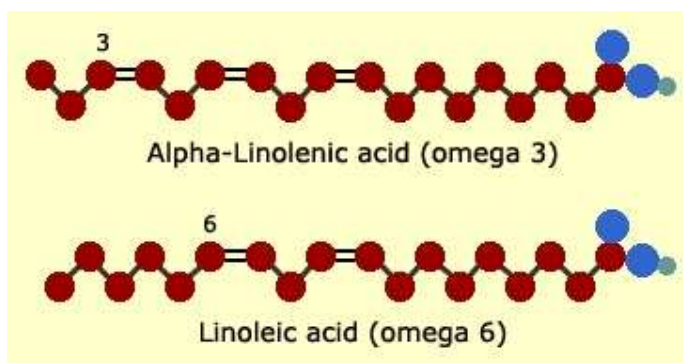
Para conseguir estos objetivos, y basándose en los hábitos alimentarios de la población española en general, la SENC realizó una serie de recomendaciones alimentarias que hacen posible un aporte de ácidos grasos acorde a lo expuesto anteriormente (Mataix y col., 2001):

- Limitar el consumo de grasa láctea, consumiendo productos desnatados o semidesnatados, y reduciendo el consumo de mantequilla.
- Limitar o evitar el consumo de alimentos que contengan ácidos grasos de tipo *trans*.
- Limitar el consumo de margarinas, seleccionando aquellas que contengan menores cantidades de AGPI.
- El aceite será preferentemente de oliva, quedando como segunda opción los aceites de semillas como girasol, maíz o soja. Dentro de los distintos aceites de oliva, se recomiendan especialmente los de tipo virgen, por su mayor capacidad antioxidante.
- Limitar el consumo de grasas procedentes de animales terrestres, seleccionando preferentemente piezas magras.
- Es más recomendable cualitativamente la grasa de aves y cerdo que la de rumiantes. No obstante, eligiendo piezas magras, dichas diferencias no son significativas.
- Limitar los embutidos a excepción del jamón, y evitar la porción grasa del mismo.
- Limitar el consumo de productos de pastelería, bollería y heladería que contengan grasa saturada.
- Finalmente, mantener o incrementar el consumo de grasa procedente de pescados.

### 1.4.3. Ácidos grasos esenciales

Los AGPI se agrupan fundamentalmente en tres familias o series: los pertenecientes a serie  $n-3$ , de los cuales su precursor es el ácido ALA, la serie  $n-6$ , de los cuales el precursor es el ácido linoleico, y la serie  $n-9$ , de los cuales el precursor es el ácido oleico. Aunque existen otras series de AGPI, como es la serie omega-7 ( $n-7$ ) o la serie omega-11 ( $n-11$ ), éstas son minoritarias dentro de la grasa de los alimentos y no alcanzan la importancia nutricional de las tres series citadas anteriormente.

La mayoría de los ácidos grasos pueden ser sintetizados por los mamíferos a partir de los hidratos de carbono de la dieta. Pero en nuestro organismo no existen mecanismos capaces de desaturar la cadena hidrocarbonada de los ácidos grasos en las posiciones 3 y 6, por este motivo los ácidos grasos linoleico ( $n-6$ ) y ALA ( $n-3$ ) (Figura 9) son ácidos grasos esenciales para el hombre y deben de ser ingeridos con los alimentos (Morimoto y otros, 2005). El ácido oleico no se considera esencial para los mamíferos, ya que puede ser sintetizado a partir del ácido esteárico (Mataix y col., 2001).



**Figura 9. Imagen de la estructura de los ácidos grasos esenciales.**

Los AGPI de cadena larga se sintetizan en el organismo a partir de estos ácidos grasos esenciales, mediante ciclos de desaturación de la cadena (con enzimas *desaturasas*) y elongación la misma (por las enzimas *elongasas*). De este modo los AGPI  $n-6$  derivan del linoleico, mientras que los  $n-3$  derivan del ALA (Figura 10). Así, el ALA ( $18:2n-6$ ) se metaboliza a ácido araquidónico (ARA,  $20:4n-6$ ), por la acción de la  $\Delta^6$ -desaturasa, de una elongasa y de una  $\Delta^5$ -desaturasa. Mientras que el ALA se transforma del modo similar en EPA y posteriormente en DHA. Sin embargo, el

mecanismo final por el que se llega a la síntesis de DHA aún no está del todo claro, aunque todo apunta a que la síntesis tiene lugar mediante elongación y  $\Delta 6$ -desaturación, seguidas por una retroconversión a través de una  $\beta$ -oxidación peroxisomal (Qiu, 2003). Todas estas transformaciones emplean rutas metabólicas similares, compitiendo por las mismas enzimas. Las reacciones enzimáticas tienen lugar en el retículo endoplasmático de las células de unos pocos órganos y tejidos, como el intestino, el hígado, el cerebro y la retina.

A priori, cabría pensar que un aporte adecuado de los dos ácidos grasos esenciales, al ser precursores de sus correspondientes series, proporcionarían un aporte adecuado de la serie de ácidos grasos completa. No obstante, en la práctica esto no es así, ya que dentro del organismo existen interacciones entre los distintos nutrientes que provocan tanto aumentos como descensos en los requerimientos de cada uno de los ácidos grasos (Gil, 2010). Tampoco es infrecuente, especialmente en niños y en adultos de edad avanzada, que debido a un déficit en alguna de las enzimas que catalizan las correspondientes vías enzimáticas, no se asegura con el aporte de estos dos ácidos grasos ya mencionados la síntesis adecuada de los distintos miembros de las familias de ácidos grasos correspondientes (Koletzko y col., 2010).

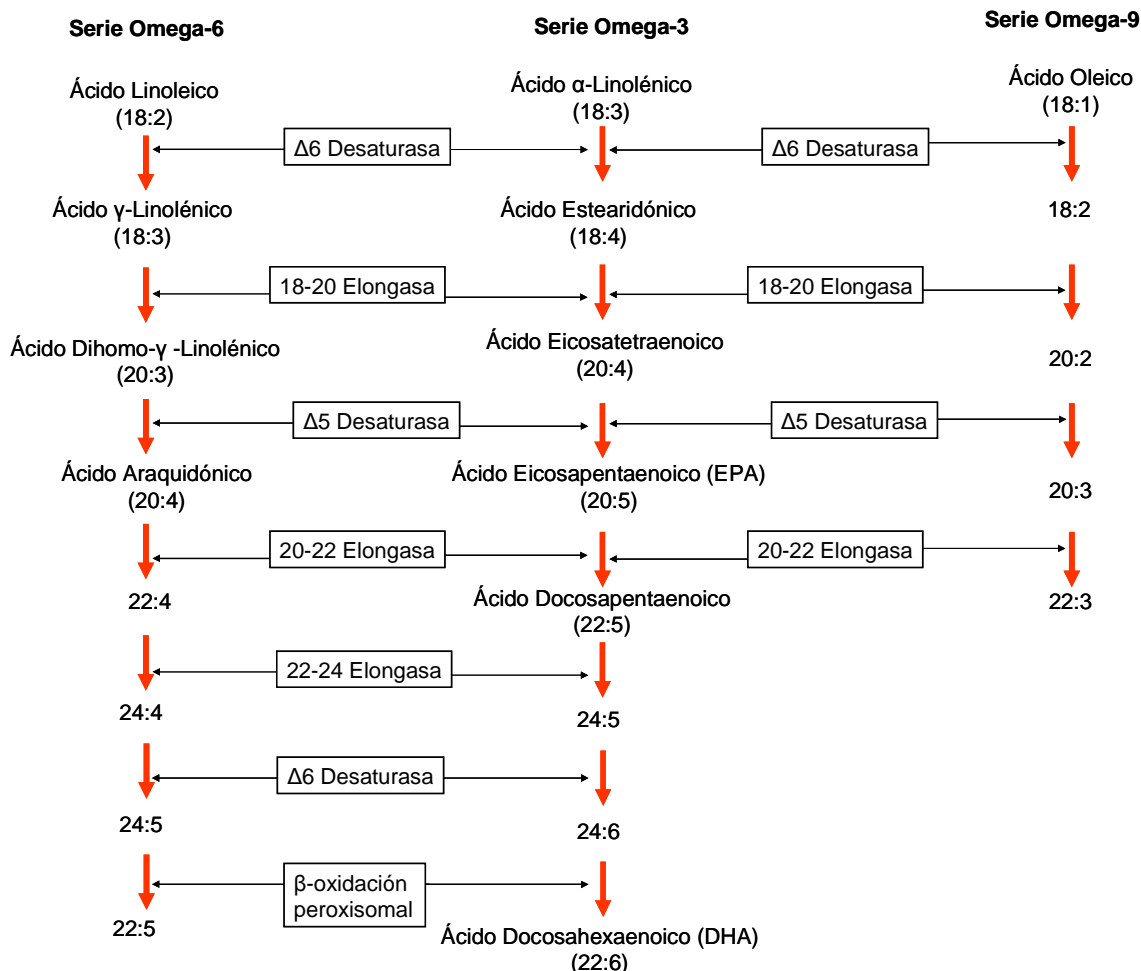


Figura 10. Esquema de la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

Las enzimas más relevantes desde el punto de vista metabólico en estos procesos son la  $\Delta^5$ -desaturasa y la  $\Delta^6$ -desaturasa, y en particular esta última. La afinidad de la  $\Delta^6$ -desaturasa por los diferentes ácidos grasos es muy distinta, siendo mayor por el ALA que por el ácido linoleico, y por este motivo, si el aporte nutricional de ALA es muy elevado, no habrá suficiente enzima y por lo tanto, disminuirá la producción de los ácidos grasos de mayor número de poliinsaturaciones pertenecientes a la serie *n*-6. No obstante, si tal y como suele suceder en los países occidentales, el aporte a través de la dieta de ácido linoleico es mucho mayor que el de ALA, la transformación de éste último en sus derivados *n*-3 será insuficiente (Gil, 2010), al haber mayor disponibilidad del sustrato de la serie *n*-6 (ácido linoleico) para dicha enzima.

Por otra parte, la afinidad de la  $\Delta^6$ -desaturasa por el ácido oleico es muy inferior a la apetencia por los ácidos ALA y linoleico. Por este motivo, sólo en casos de deficiencia grave de ácidos grasos esenciales se forman AGPI a partir del oleico. Por

tanto, si la transformación del ALA y del ácido linoleico en sus respectivos ácidos grasos de cadena larga es inhibida totalmente, se formará a partir del ácido oleico una alta proporción de un ácido graso de cadena larga de la serie *n*-9, el ácido 5,8,11-eicosatrienoico (20:3*n*-9), como un efecto compensatorio a la carencia de ácidos grasos de cadena larga pertenecientes a la serie *n*-3 y *n*-6. La acumulación de este ácido graso puede tomarse, por lo tanto, como una clara señal de insuficiente aporte de ALA y linoleico en nuestra dieta (Valenzuela y Morgano, 1999).

Como se ha visto, el ácido ALA es precursor del DHA, pero a la vez compete con él por la  $\Delta^6$ -desaturasa. Debido a esto se ha observado que la ingesta de ácido ALA tiene una relación directa con los niveles de EPA en hígado, eritrocitos y cerebro, pero no con los niveles de DHA. De hecho, la concentración de DHA en estos tejidos se incrementa cuando la ingesta de ácido ALA empieza a disminuir a partir de un cierto nivel (Blank y col., 2002; Cleland y col., 2005)

Aproximadamente, el 95% del ácido linoleico que se aporta por la dieta es oxidado en las mitocondrias, con la finalidad de obtener energía, y sólo un pequeño porcentaje (5%) es transformado en ARA, el principal producto metabólico de la serie *n*-6. Esta transformación ocurre sobre todo en el hígado, desde donde es transportado hacia los tejidos periféricos, principalmente hacia el cerebro, órganos visuales y en caso de los hombres hacia los testículos (Gil, 2010).

El ALA aportado por la dieta es también oxidado en su mayor parte (alrededor de un 85%), y el resto se transforma fundamentalmente en DHA, su principal producto metabólico. Esta transformación también ocurre principalmente en el hígado, y desde este órgano sería transportado por la misma vía y hacia los mismos órganos que el ARA. Durante el embarazo, además de en el hígado, éste ácido graso también se acumula en el tejido adiposo (Gil-Campos y Dalmau-Serra, 2010). Además, las células del endotelio cerebrovascular son susceptibles de convertir más del 50% del ALA que reciben en EPA y a continuación, los astrocitos (células de la sustancia gris del sistema nervioso) transforman el EPA en DHA (Guesnet y col., 1993)

Los ácidos grasos de las familias *n*-6 y *n*-3 además de ser una fuente de energía, resultan indispensables por formar parte de los fosfolípidos de las membranas celulares. Algunos de estos ácidos grasos, todos ellos de 20 átomos de carbono (el di-homo-

gamma-linolénico o 20:3 $n$ -6, el ARA o 20:4 $n$ -6 y el EPA o 20:5 $n$ -3), son precursores de los eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos), sustancias similares a las hormonas, que participan en los procesos inflamatorios, pero al contrario de éstas y debido a su potente actividad, deben ser generados en las células donde vayan a actuar. Cuando hay deficiencia de estos ácidos grasos se modifica la estructura y la función de las membranas, de forma que se altera el mecanismo de señalización celular.

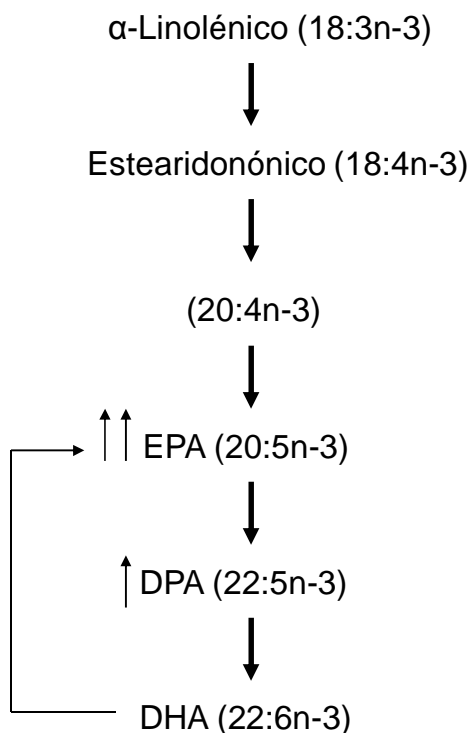
Las carencias de ácidos grasos esenciales en el hombre son raras y las causas excepcionales serían la alimentación parenteral prolongada, sin grasa y la alimentación prolongada exclusiva del recién nacido con leche de vaca. La leche materna es una fuente segura de ácidos grasos  $n$ -3. Se discute, si los recién nacidos con bajo peso y muy inmaduros pueden beneficiarse de fuentes dietéticas de ácidos grasos DHA y ARA, pues la misma inmadurez hace que no dispongan de las enzimas que desaturan y alargan las cadenas de ácidos grasos (Innis, 1993). Las carencias de ácidos grasos esenciales ocasionarían ciertas encefalopatías infantiles, retardo de la cicatrización y trastornos de los lípidos plasmáticos. Las deficiencias de ácidos grasos poliinsaturados en general, producen cambios estructurales en las criptas, vellosidades y microvellosidades intestinales que influyen las funciones intestinales (Debry y Pelletier, 1991).

#### *1.4.4. Propiedades funcionales de los ácidos grasos omega-3*

Los tres ácidos grasos de la serie  $n$ -3 más importantes, fisiológicamente hablando, son el ALA, el EPA y el DHA. Sólo pequeñas cantidades de ALA y de EPA están presentes en los tejidos, y el contenido en DHA es habitualmente entre 5-30 veces superior al del EPA en la mayoría de los órganos. Además, el DHA es unas 100 veces más abundante que el EPA en el cerebro y la retina.

Aunque los tres ácidos grasos están relacionados metabólicamente, diversos estudios han demostrado que la administración de ALA no genera las cantidades fisiológicas necesarias de DHA y de EPA, ya que en humanos, la capacidad endógena de convertir ALA en DHA o EPA es muy baja. Por eso, en cuanto a la administración de DHA o EPA, las últimas recomendaciones sugieren que la vía más eficiente para el incremento de las concentraciones de un ácido graso  $n$ -3 es la administración de dicho

ácido graso específicamente. De todas maneras en un planteamiento más general la administración de DHA garantiza una concentración básica de EPA, mientras que la administración exclusiva de este último disminuye la concentración de DHA debido a la retroconversión de DHA en EPA (Figura 11). De este modo, el consumo de DHA en la dieta puede ser crítico para mantener la concentración adecuada del mismo.



**Figura 11. Retroconversión de ácido docosaheptaenoico (DHA) en ácido eicosapentaenoico (EPA)**

Importantes estudios epidemiológicos han asociado la tasa de mortalidad coronaria y la tasa de eventos cardiovasculares, en especial la muerte súbita con los niveles plasmáticos y plaquetarios de EPA y DHA. (Albert y col., 2002; Siscovick y col., 1995). En especial, el EPA minimiza el riesgo de contraer enfermedades coronarias, reduce la presión arterial, inhiben la coagulación de la sangre y posee efectos antiinflamatorios (Mataix y Gil, 2004, Mata y Ortega, 2003).

El DHA es esencial para una función celular normal y para el crecimiento y desarrollo normal del tejido neuronal en niños. Es el ácido graso *n*-3 más abundante en las membranas celulares y está presente en todos los órganos. Es particularmente el más

abundante en el sistema nervioso central, en el esperma y en la retina, además del más variable entre los órganos.

Los *n*-3 son nutrientes importantes del cerebro. Ya que cerca del 60% del peso del cerebro humano es grasa y presenta un alto contenido de DHA, que es el ácido graso natural más insaturado. El DHA protege a las neuronas contra la apoptosis, por lo que se ha aventurado la hipótesis de que elevadas concentraciones de DHA en el cerebro pueden mejorar la supervivencia neuronal. Un déficit en DHA en el organismo va a causar modificaciones en las propiedades físicas de las membranas, alteraciones en la conducción nerviosa y alteraciones en la secreción de neurotransmisores y su recaptación, así como en los procesos de la transmisión postsináptica. De este modo, los tipos y las proporciones de grasas que forman las membranas de las células del cerebro determinarán la eficacia en su comunicación.

La gestación es el período de mayor necesidad de ácidos grasos esenciales y AGPI. En las primeras etapas de desarrollo, la ingesta de cantidades adecuadas de ácidos grasos esenciales, así como de DHA, permite la correcta formación del sistema nervioso, concretamente del cerebro y también de la retina (Gil y col., 2003). Durante el último trimestre de embarazo y los primeros meses postnatales es muy importante el crecimiento del cerebro humano, con un gran aumento en el contenido cerebral de ácido ARA (C20:4*n*-6) y DHA. El feto y el niño recién nacido dependen del suministro maternal de estos ácidos grasos. Durante el embarazo y la lactancia, una ingesta de altas cantidades de estos ácidos grasos beneficiaría al niño por lo que es importante que las madres ingieran cantidades adecuadas de pescado durante la gestación y la lactancia. La suplementación de la dieta maternal durante el embarazo con AGPI *n*-3 podría prevenir el desarrollo de alergias (Dunstan y col., 2003).

Es también conocido que el déficit de DHA durante la infancia está asociado con la aparición de enfermedades como la hiperactividad, déficit de atención, fenilcetonuria y fibrosis quística durante la infancia, y posteriormente, cuando la persona llega a la edad adulta, a un envejecimiento más rápido y a una mayor probabilidad de aparición de la enfermedad de Alzheimer (Riediger y col., 2009). Por todos estos motivos, en los últimos años un comité de expertos ha concluido que, basados en las evidencias científicas, en la fórmula infantil se deben añadir al menos el 0,2% de los ácidos grasos como DHA, aunque éstos no deben exceder el 0,5% del total de ácidos grasos, ya que

todavía no han sido suficientemente evaluados los efectos de una ingesta mayor. También es conocido que la cantidad de EPA no debe superar la de DHA (Lien y Clandinin, 2009; Gil-Campos y Dalmau-Serra, 2010).

Los ácidos grasos *n*-3 pueden tener un efecto beneficioso en el humor irritable. Los bajos niveles de ácidos grasos *n*-3 encontrados en las membranas de los glóbulos rojos de pacientes deprimidos parecen indicar que los ácidos grasos *n*-3 pueden ser útiles en tratar desórdenes de humor (Peet y col., 1998). Otros estudios revelaron también que el éster etílico del EPA puede resultar efectivo en la estabilización de pacientes deprimidos (Nemets y col., 2002), y que el DHA puede ayudar a controlar las tendencias agresivas en situaciones de estrés (Hamazaki y col., 1996).

Otro de los efectos beneficiosos de los AGPI, y especialmente de los pertenecientes a la serie *n*-3, es su efecto en la prevención del cáncer, especialmente en el caso del cáncer de mama, colon y en el melanoma maligno cutáneo. Puesto que ralentizan el crecimiento de las células cancerígenas. Existen trabajos que relaciona una ingesta adecuada de ácidos grasos *n*-3 con una reducción de la dosis, tiempo y ciclos de quimioterapia, mejorando así la vida de los pacientes con cáncer (Gil, 2010).

#### *1.4.5. Relación entre la digestión de los lípidos y la composición de los productos animales*

La digestión de los lípidos en los animales, según sean rumiantes o no, tiene un efecto primordial en la transferencia de ácidos grasos de la dieta a los productos animales. La digestión de los lípidos en los animales no-rumiantes se produce principalmente en el intestino delgado y son absorbidos en los tejidos sin sufrir ninguna modificación. Por lo tanto, la fuente de la que proceden los lípidos de la dieta influye directamente en la composición de ácidos grasos de los productos de animales como el cerdo y las aves de corral. Con lo cual, la proporción de ácidos grasos insaturados (AGI) en los tejidos de estos animales puede incrementarse sencillamente aumentando la proporción de estos ácidos grasos en la dieta (Woods y col., 2009).

Por el contrario, en el caso de los rumiantes, los microorganismos que se encuentran en el rumen producen grandes modificaciones en la composición de ácidos grasos que salen el rumen para ser absorbidos en el intestino delgado (Jenkins, 1993).

La absorción de AGI en el intestino de los rumiantes y no-rumiantes es similar, pero varía en el caso de los AGS. Estos últimos se adsorben más en el caso de los rumiantes. Esta mayor eficiencia en la absorción de AGS por los rumiantes se atribuye a la mayor capacidad de la bilis y del sistema micelar de lisofosfolípidos para solubilizar ácidos grasos, así como a la acidez del medio en el duodeno y el yeyuno (pH 3,0–6,0). Este pH tan bajo disminuye la conversión de AGS en sales insolubles de calcio, que no pueden ser absorbidas (Bauchart, 1993).

Una diferencia importante entre no-rumiantes y rumiantes es que los AGPI de cadena larga, C20 y C22, no se integran en los triacilglicérols en cantidades importantes sino que se integran en los fosfolípidos de membrana en cantidades significativas y pasan a formar parte del tejido intramuscular (Enser y col., 1996). Además, se producirá una transferencia muy baja de AGPI de cadena larga a la grasa de la leche, ya que los fosfolípidos del plasma que transportan estos ácidos grasos son un sustrato pobre para la lipoproteinlipasa de la glándula mamaria (Offer y col., 1999).

## **1.5. La carne**

La industria cárnica es un sector de primer orden dentro del tejido empresarial español. Para mantener este potencial de producción y transformación cárnica son necesarios una serie de aspectos claves, entre los que destaca la innovación y el desarrollo tecnológico, que ofrezca nuevos productos y alternativas de consumo a los productos tradicionales. En este sentido el desarrollo de productos cárnicos funcionales representa una oportunidad de ocupar nuevos nichos de mercado.

El consumo de carne es muy alto en las sociedades desarrolladas, representando aproximadamente el 20 % de la ingesta calórica. (González Svatetz y Serra Majen, 2006). En España, desde 1964, se ha producido un importante aumento en el consumo de carne, mucho mayor que el de cualquier otro grupo de alimentos. Este consumo de carne era de 77 g/persona y día en 1964 y alcanzó un máximo con 190 g en 1992. En los años siguientes se produjo un ligero descenso y en 2002 el consumo de carne volvió a alcanzar los 186 g/persona y día (MAPA, 1992-2003; Carbajal Azcona, 2005).

En 2007 se estimó que el consumo de carne rondaba los 65 Kg por persona (178 g/ persona y día). El consumo per cápita de carne de vacuno ha sido bastante estable en los últimos años y en el 2007 supuso entorno a los 10 Kg por persona. En el hogar, en estos últimos años, se ha reducido el consumo per cápita de vacuno, mientras que las carnes transformadas han experimentado oscilaciones de distinto grado y sentido. Por otro lado, para la demanda extradoméstica, las subidas del consumo per cápita son generalizadas para todos los tipos de carne y los incrementos más elevados se asocian a la demanda de carnes transformadas (Martín Cerdeño, 2008).

El consumo medio de carnes en España supone un aporte al total de la dieta del 16 % de la energía total consumida, 28 % de la proteína; 28 % de los lípidos, un 17 % del hierro y un 26 % del zinc (FEN, 2007).

#### *1.5.1. Composición nutricional de la carne de vacuno*

La carne y los productos cárnicos tienen una imagen negativa desde el punto de vista de la salud, debido a su alto contenido de materia grasa, niveles altos de ácidos grasos saturados, colesterol, sodio y contenido calórico (Whitney y Rolfes, 2002). Por el elevado contenido en grasa, especialmente la carne roja que es considerada como un alimento promotor del cáncer. Por lo tanto, se recomienda un consumo bajo de carne, principalmente roja para evitar el riesgo de cáncer, la obesidad y el síndrome metabólico. Sin embargo, los productos cárnicos son fuentes importantes de micronutrientes como el hierro, el selenio, las vitaminas A, B12 y ácido fólico, y también de proteína, grasa y aminoácidos esenciales. Además, la carne tienen un bajo índice glicémico lo cual, contradictoriamente la hace beneficiosa con respecto al control de peso, el desarrollo de la diabetes y el cáncer debido a la resistencia a la insulina (Biesalski, 2005). Por todo ello, sería muy interesante si se mantuviesen y potenciasen las cualidades positivas de los productos cárnicos y se disminuyesen las negativas.

La composición en ácidos grasos de la carne de los rumiantes es generalmente más saturada debido al hecho de que los ácidos grasos insaturados son sujetos a biohidrogenación en el rumen a ácido esteárico en última instancia (Decker y Park, 2010).

Según la pieza cárnica de la que se trate, el contenido en grasa y el perfil lipídico varían significativamente (Tabla 2). Las carnes magras contienen una pequeña cantidad de grasa (< 10 %) que se multiplica por 3 ó 4 en las carnes grasas. La calidad de esa grasa depende del animal. No obstante, aproximadamente la mitad de la grasa de la carne es saturada. Los AGS predominantes son el ácido palmítico (C16:0) y el esteárico (C18:0) y en menor cantidad el mirístico (C14:0), siendo este último el más aterogénico. Entre los ácidos grasos insaturados predominan los monoinsaturados, representados mayoritariamente por el ácido oleico (C18:1). En cuanto al ácido linoleico (C18:2), que es el ácido graso poliinsaturado predominante, se encuentra en cantidades muy inferiores. Los ácidos grasos *n*-3 están representados casi exclusivamente por el ALA (C18:3) y sus cantidades son también pequeñas (Carbajal Azcona, 2005).

**Tabla 2. Contenido de grasa y ácidos grasos en g/100g de carne de vacuno**

Vacuno	Grasa total	AGS	AGMI	AGPI <i>n</i> -6	AGPI <i>n</i> -3	<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3
Magro	4,3	1,7	1,8	0,17	0,07	2,42
Graso	43,0	20,0	17,3	0,93	0,27	3,44

La carne de los rumiantes es también una fuente de ácidos grasos *trans* (AGt) naturales, como el CLA que se encuentra en cantidades entre 1,2 y 6,2 mg/g de grasa en vacuno (Eynard y López, 2003). En cuanto a la cantidad de colesterol, depende también de la pieza cárnica y del animal, siendo para el caso del pecho de ternera aproximadamente de 73 mg/100g de carne.

### *1.5.2. La composición de los preparados de carne para hamburguesa*

En general, la mayoría de los productos cárnicos se caracterizan por un elevado contenido graso, muy por encima de las piezas cárnicas del animal de origen, ya que contienen grasas añadidas.

En el caso de las hamburguesas que se pueden encontrar en el mercado, la cantidad de grasa de su formulación varía. Organolépticamente se prefieren las hamburguesas cuyo porcentaje graso total es mayor del 10 %, para lo cual es

imprescindible añadir grasa a la carne. Esta práctica también permite abaratar significativamente las hamburguesas. La grasa a añadir a la carne será suficiente para conseguir un porcentaje final de aproximadamente el 16-20 %, y lo normal es que la procedencia de la grasa sea la misma que la de la carne (García de Fernando y Sanz, 1986).

Sin embargo, debido a la enorme variedad de ingredientes y sus proporciones en las hamburguesas, es difícil generalizar sobre su composición. Existen hamburguesas muy ricas nutritivamente hablando, que poseen un elevado contenido de carne de buena calidad, con escasa cantidad de tejido conjuntivo, representando así un aporte proteínico de gran valor biológico. Pero puede haberlas de menor valor nutritivo, por tener más grasa y abundante tejido conjuntivo, etc. La tabla 3 es una adaptación de la elaborada por Paul y Southgate (1979). En ella se recoge la composición media por 100 g de 36 muestras de hamburguesas de vacuno procedentes de 6 marcas diferentes.

**Tabla 3. Composición por 100g de 36 hamburguesas congeladas de vacuno de 6 marcas distintas**

	<b>Cruda</b>	<b>Frita</b>
Peso comestible/ peso comprado(g)	1,0	0,76
Agua (g)	56,3	53,0
Kcal.	265	264
Proteínas (g)	15,2	20,4
Grasas (g)	20,5	17,3
Hidratos de Carbono (g)	5,3	7,0
Sodio (mg)	600	800

Aunque su valor energético no es excesivo, su contenido graso es elevado, aun teniendo en cuenta las pérdidas de grasa que se producen en el cocinado. Además presentan un elevado contenido en sodio que aparece más concentrado en después del cocinado. Por estos motivos, entre otros, es por lo que los preparados de carne del tipo de las hamburguesas tienen tan mala prensa.

### 1.5.3. Productos cárnicos con propiedades funcionales

En los últimos años, ha aumentado rápidamente la demanda por parte del consumidor de carne y productos cárnicos más sanos con bajo nivel de grasa, colesterol, cloruro sódico y nitrito, con un mejor perfil de ácidos grasos y otros ingredientes que contribuyen a mejorar la salud. Por todo ello se ha prestado una gran atención al desarrollo de carne y productos cárnicos con funciones fisiológicas para mejorar la salud y prevenir el riesgo de enfermedades. En la actualidad se trabaja en tres frentes diferentes para obtener derivados cárnicos funcionales: Actuación sobre el genoma; sobre la alimentación animal y/o sobre el proceso de elaboración del derivado cárnico. Así, para obtener productos cárnicos mejorados puede añadirse directamente a los productos cárnicos el ingrediente funcional de interés durante el procesamiento, para mejorar su valor nutricional.

Por otro lado, las autoridades sanitarias recomiendan aumentar el consumo de AGPI *n*-3, en especial los de cadena larga (EPA y DHA), para ello se considera que el consumo de 30-60 g/día pescado azul permite cubrir los requerimientos de estos ácidos grasos. Sin embargo, las sociedades occidentales modernas tienden a incluir muy poco pescado en la dieta. Además la escasez de pescado y su elevado coste hace que en muchas ocasiones el consumidor prefiera otros alimentos de mayor comodidad y menor precio. Esta es una de las razones que explican la aparición durante los últimos años de varios productos enriquecidos con ácidos grasos *n*-3, que tratan de contribuir a satisfacer los requerimientos nutritivos de estos lípidos.

Para reducir el contenido de alguno de los componentes nutritivos negativos de los productos cárnicos como la grasa, habitualmente se opta por la selección de los cortes cárnicos adecuados (materias primas cárnicas más magras), eliminar la grasa, o manipular la dieta de los animales para alterar su composición en ácidos grasos, de este modo se consigue la disminución de la densidad de grasa y calorías (Decker y Park, 2010). También, mediante la adición de agua y otros ingredientes con escasa o nula aportación de grasa.

La posibilidad de reducir el colesterol pasa por la sustitución de materias primas de origen cárnico por otras de origen vegetal (aceites y proteínas vegetales) que no contienen colesterol.

La mejora del perfil lipídico puede conseguirse reemplazando la grasa animal por otra con unas características más acordes con las recomendaciones relativas a la salud, por tanto con menor proporción de AGS y mayor de AGMI o AGPI y mejor relación  $n-6/n-3$ , ya que de forma natural, la mayoría de las carnes poseen una relación  $n-6/n-3$  superior a 15. Para conseguir dichos efectos se pueden emplear tanto aceites de pescado como aceites vegetales. Aunque para obtener mayor efecto saludable, los AGPI  $n-3$  incorporados deben ser de cadena larga (como EPA y DHA). Los aceites empleados deben dosificarse específicamente según el perfil lipídico de cada producto en concreto.

Es imprescindible acompañar la adición de los  $n-3$  con antioxidantes, por varios motivos. Primero, para protegerlos de la degradación durante los procesos de elaboración o durante la vida útil del producto y su preparación culinaria doméstica. En segundo lugar, para evitar que su ingestión provoque un aumento del estrés oxidativo corporal. Finalmente, para conseguir una sinergia con los  $n-3$  en su efecto sobre la expresión génica. Los diterpenos fenólicos del romero actúan como antioxidantes primarios y sinérgicos. Concretamente, el  $\alpha$ -tocoferol actúan sinérgicamente potenciando la acción del antioxidante.

Una vez incorporada la mezcla de AGPI  $n-3$  y antioxidantes a los productos cárnicos, es imprescindible comprobar mediante análisis químico y funcional, que los ingredientes funcionales se mantienen inalterados durante los procesos de fabricación y conservación a lo largo de su vida útil, así como también tras su tratamiento culinario. De esta forma se garantiza que el potencial saludable de los productos etiquetados es adecuado en el momento de su consumo (Palanca y col., 2006).

Además de todas estas mejoras en la composición de los productos cárnicos, también hay que tener en cuenta, que en la elaboración de estos productos se emplean algunos ingredientes procedentes de vegetales, huevo, o leche que contienen sustancias capaces de producir reacciones alérgicas en algunos consumidores. La exclusión de tales ingredientes de su formulación puede dar origen a una nueva gama de productos libres de alergen.

## **1.6. El pescado**

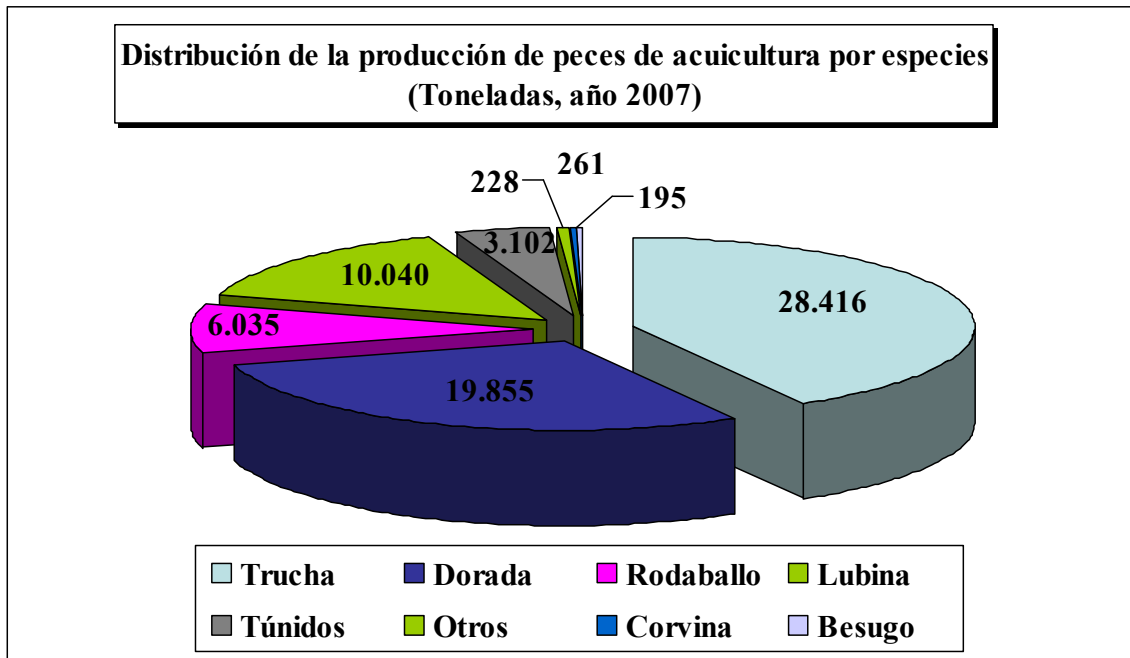
El crecimiento de la población a nivel mundial y el interés por mejorar la calidad de vida mediante una dieta sana, equilibrada y variada, ha contribuido al aumento de la demanda de pescado. En España existe gran tradición de consumo de productos de la pesca y derivados, que nos sitúa entre los primeros países del mundo (FEN, 2007). Con el paso de los años la demanda de pescado de los hogares españoles ha ido aumentando. La preocupación por la salud y la seguridad alimentaria, la progresiva incorporación de la mujer al mercado laboral o la importancia creciente del gasto en alimentación fuera del hogar han sido algunas de las cuestiones sociales que han favorecido la generalización de la demanda del pescado y sus derivados dentro del sistema alimentario español. La evolución de esta demanda ha sido notable durante el periodo 1997-2007. En 1987 se consumían en torno a 30 kilos de pescado por persona y en 2007 el consumo rondaba los 39 kilos (Martín Cerdeño, 2008).

Por otro lado, la FAO indica que el aprovechamiento de la pesca extractiva ha tocado techo y, el incremento de producción de necesario para satisfacer la demanda deberá provenir de la acuicultura. El crecimiento de la producción acuícola mundial es del 10% anual según la FAO. La pesca extractiva tiende al estancamiento mientras que, la producción acuícola va en aumento y se prevé que en el año 2025 la acuicultura supondrá más de la mitad de la producción pesquera total (MARM, 2007).

El sector acuícola en Europa produce en torno a 1,3 millones de toneladas/año. El mejillón, la trucha arco-iris y el salmón son globalmente las especies más producidas en la Unión Europea, pero otras especies como la dorada, la lubina, y la carpa contribuyen de forma importante a dicha producción (MARM, 2007).

En España, la acuicultura ha pasado de ser un sector tradicional, centrado en economías familiares, a una industria moderna altamente tecnificada, con empresas competitivas a nivel mundial y con un grado creciente de diversificación. España es un país con una enorme diversidad de costas, lo cual ha favorecido la especialización en los cultivos de peces marinos. Así, en el periodo 2000-2004 la producción de peces marinos sufrió un fuerte incremento. Dentro de las especies marinas destacan como principales especies la dorada, la lubina y el rodaballo (Figura 12). En el Cantábrico y Galicia se

desarrolla el cultivo de rodaballo que se realiza en instalaciones en tierra con aporte de agua de mar oceánica. Mientras que en regiones de aguas más templadas, Mediterráneo y Atlántico sur, se ha desarrollado el cultivo de dorada y lubina (MARM, 2007).



Fuente: MARM 2009

Figura 12: Principales especies de peces de acuicultura producidas en España.

En acuicultura, el alimento que se proporciona mayoritariamente a los ejemplares consiste en harina y aceite de pescado. Estos productos se obtienen de la pesca, por lo que se trata de un sector que transforma proteína de pescado de escaso valor comercial, en proteína de pescado de mayor calidad y valor. Al depender de la pesca para la obtención de piensos, la acuicultura se enfrenta al mismo problema de escasez de recursos, por lo que es importante cualquier investigación o innovación que consiga sustituir las fuentes de alimentación del pescado (MARM, 2007). Sin embargo, estos estudios deberán realizarse cuidadosamente, ya que la alimentación es un factor decisivo para conservar las propiedades lo mejor posible nutritivas originales del pescado procedente de la pesca.

### *1.6.1. Composición del pescado*

Desde el punto de vista nutricional, el pescado presenta fácil digestibilidad, excelente valor proteico y grasa de gran valor nutricional, además de aportar minerales y vitaminas y poseer solo trazas de hidratos de carbono. Todo esto lo convierten en un alimento de primera categoría. Se compone básicamente de agua, proteínas y una pequeña proporción de grasa poliinsaturada. La proteína es de alto valor biológico, aunque su proporción es más baja que en la carne ya que el pescado presenta mayor proporción de agua. Además, el pescado contiene menos colágeno, lo cual contribuye a su digestibilidad y blandura.

Los datos de composición química que existen para el pescado son muy variables, dependen de varios factores; factores extrínsecos como la variabilidad estacional, el método de captura, la alimentación, la temperatura de las aguas, el hábitat geográfico y factores intrínsecos, como son los genéticos, morfológicos, etc. Además, es bien conocido que la composición en ácidos grasos de los alimentos de origen animal no rumiantes, como el cerdo, las aves de corral y también el pescado puede ser alterada por la dieta, para aumentar su proporción de ácidos grasos insaturados (Decker y Park, 2010).

En general, las especies demersales suministran fundamentalmente proteína, su contenido en lípidos es bajo, salvo en el caso del hígado, como el del Bacalao, que se usa para la obtención de aceites de pescado. Las especies pelágicas como los escómbridos y escomberomóridos presentan concentraciones en el músculo más elevadas, lo cual aumenta mucho su valor calórico, a pesar de esto, son muy apreciadas nutricionalmente dada la calidad de su grasa poliinsaturada.

Los organismos marinos son considerados también una buena fuente de minerales esenciales, ya que absorben minerales de la dieta y del agua. Además, la concentración de minerales en el pescado está influida tanto por la especie de pescado como por factores estacionales, aspectos biológicos y por la alimentación del pescado (Aubourg y col., 2007).

La característica especial que diferencia a los lípidos de las especies marinas de los lípidos de animales terrestres es que son fuente de AGPI de cadena larga, *n*-3

(excepto la anguila), en particular, EPA, DHA y, en menor cantidad DPA. El consumo de pescado azul es importante también por su aporte de oleico y linoleico. La proporción de ácidos grasos  $n-3$  depende de varios factores que afectan al pescado como son la edad, el tamaño y principalmente la época del año. Otro factor es el origen, ya que los el grado de instauración y la longitud de los ácidos grasos aumenta conforme aumenta la salinidad y la frialdad del agua, de este modo, pescados de agua dulce contienen menor proporción de  $n-3$  y también presentan valores más altos de  $n-3$  los de aguas frías como la caballa o el salmón. La alimentación del pez también influye, los que se alimentan de plancton, muy rico en  $n-3$ , como las anchoas, el bonito o el atún, tienen mayor cantidad de estos ácidos grasos.

### *1.6.2. El pescado como alimento funcional.*

El pescado puede ser considerado un alimento funcional en sí mismo, no es necesario que esté enriquecido. Ya que está demostrado que aportan componentes que afectan beneficiosamente al organismo humano proporcionando un mejor estado de salud y bienestar. De hecho, se ha demostrado que el aumento en el consumo de pescado es la única manera práctica de aumentar las cantidades dietéticas de AGPI  $n-3$  de cadena larga como el EPA y el DHA y para conseguir una proporción más equilibrada de  $n-6/n-3$  en la dieta.

En la actualidad se recomienda el consumo de pescado azul, en especial para las personas con riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares o una trombosis. Este interés por los  $n-3$  procedentes del pescado comenzó a raíz de los trabajos publicados en los años 70 por Bang, en los que se sugería que la abundancia de ácidos grasos  $n-3$ , en la dieta de los esquimales de Groenlandia, era la responsable de la baja mortalidad por cardiopatía isquémica en comparación con los esquimales que habían emigrado a Dinamarca (Bang y col., 1972 y 1976), son muchos los estudios que han apoyado esta teoría protectora frente a determinadas enfermedades cardiovasculares. De este modo, la mayoría de los estudios de observación establecen una relación inversa entre la frecuencia en el consumo de pescado y la muerte por enfermedad coronaria (Kromhout y col., 1985; Daviglus y col., 1997; Hu y col., 2002), estableciendo que a medida que aumenta el consumo semanal de pescado, disminuye el riesgo de muerte por enfermedad coronaria. En pacientes con una historia de infarto de miocardio se ha

observado, que aproximadamente cada aumento de 20 g/día en la ingesta de pescado supone descenso de un 7% en el riesgo de muerte por enfermedad coronaria (He y col., 2004). Finalmente, se ha establecido que el consumo de 40-60 g diarios de pescado disminuye la probabilidad de aparición de enfermedades cardiovasculares en pacientes de riesgo en un 30% (Mataix y col., 2001).

Un consumo regular de pescado en niños de menos de un año, podría asociarse con una reducción del riesgo de padecer alergias y de sensibilización a alérgenos de alimentos y por inhalación durante los primeros 4 años de vida (Calvani y col., 2006; Kull y col., 2006). No obstante, también debemos tener en cuenta que en algunos pescados azules, especialmente en los de escala trófica superior (túridos, salmónidos, pez espada, etc), hay frecuentemente concentraciones elevadas de contaminantes como el metil-mercurio, que pueden afectar fundamentalmente al desarrollo cerebral y al crecimiento en la infancia, por lo que hay que limitar su consumo, especialmente en mujeres gestantes y niños (Gil-Campos y Dalmau-Serra, 2010). Por este motivo, a pesar de la enorme importancia que el consumo de estos ácidos grasos, y especialmente del DHA, en estas etapas de la vida, deben adoptarse precauciones a la hora de recomendar un elevado consumo de pescado azul, al menos de las especies de mayor talla. Por este motivo, una interesante alternativa para el consumo de estos alimentos sería el consumo de alimentos enriquecidos en ácidos grasos *n*-3, a través de los cuales podamos cubrir nuestras necesidades diarias sin necesidad de modificar nuestros hábitos alimenticios.

Otros beneficios derivados del consumo del pescado y aceite de pescado hacen referencia a la mejora de la sintomatología de ciertos desórdenes psiquiátricos como trastornos bipolares y esquizofrénicos. Que se relacionan en especial con el consumo de EPA (Stoll y col., 1999).

### *1.6.3. Comparación entre pescados salvajes y procedentes de la acuicultura*

En los últimos años, debido al creciente auge de la acuicultura, se han realizado diversos estudios comparativos entre ejemplares de especies de peces procedentes de cultivo y procedentes de la pesca extractiva, en cuanto a valor nutricional y contaminantes. En el besugo de cultivo se encontraron valores superiores de lípidos que

en el salvaje, los valores para los ácidos grasos saturados fueron similares en ambos casos, mientras que los de monoinsaturados fueron superiores para el besugo cultivado y los poliinsaturados superiores en los ejemplares salvajes (Alvarez y col., 2009).

En el caso de la corvina se encontró que los ejemplares salvajes presentaban menor contenido en materia grasa. En el perfil de ácidos grasos de dicha grasa, los ejemplares de cultivo presentaron mayor cantidad de monoinsaturados y menor proporción de poliinsaturados (AGPI). Dentro de este último grupo los ácidos grasos *n*-3, fueron predominantes en la corvina salvaje, mientras los *n*-6 fueron más abundantes en la de cultivo (Fuentes y col., 2010). Resultados similares se han encontrado para la trucha (Kaya y Erdem, 2009).

Así, por regla general el pescado de cultivo se caracteriza por valores más altos de grasa y ácidos grasos omega-6 que sus congéneres salvajes, debido a la presencia abundante de ácidos grasos omega-6 en los aceites vegetales que se utilizan para sustituir parcialmente al aceite de pescado en las formulaciones del alimento para pescado (Grigorakis, 2007; Busetto y col., 2008). Por lo tanto, las diferencias en el perfil lipídico del pescado procedente de la pesca y el procedente del cultivo intensivo dependen de las fuentes de alimentación de los ejemplares y utilizando fuentes de ácidos grasos específicas en las fórmulas utilizadas para la alimentación del pescado podrían eliminarse estas diferencias (Gessner y col., 2008).

## **1.7. La leche**

La demanda de leche y productos lácteos es importante en los hogares españoles y su consumo se extiende a la práctica totalidad de los consumidores. En el consumo global de estos productos se ha producido un importante descenso en su compra entre los años 2000 (416 g/persona y día) y 2006 (379 g/persona y día), sin embargo, el consumo de lácteos ha aumentado entre 1964 (228 g/persona y día) y 2006 en aproximadamente 150 g/persona y día (FEN, 2007). Por otro lado, se está produciendo un trasvase del consumo de leche hacia otros productos lácteos. En 1987 se consumían, 124 l de leche por persona, 8 Kg de yogur, 6 Kg de queso y 1,9 Kg de otros productos

lácteos. En 2007, el consumo de leche fue de 94 l por persona, 10 Kg de yogur, 7 Kg de queso y 15,7 Kg de otros productos lácteos (Martín Cerdeño, 2008).

### 1.7.1. La grasa de la leche

La leche de vaca contiene entre un 3 y un 5 % de lípidos, aunque en la actualidad la media está en 3,34 % (Tabla 4). Estos lípidos se encuentran formando glóbulos que contienen triglicéridos, ésteres de colesterol y ésteres de retinol. En los lípidos de la leche hay mayoritariamente triglicéridos, que suponen un 97-98% de los lípidos. El resto de los componentes están en muy pequeña proporción siendo los más destacados los fosfolípidos (0,2-1 %), los diglicéridos (0,28-0,59 %), y colesterol (0,419 %) (Jensen, 2002). En la grasa de la leche se han identificado más de 400 ácidos grasos, de los cuales sólo 15 aparecen en concentraciones superiores al 1%, todos ellos presentan un número par de átomos de carbono y no son ramificados.

**Tabla 4. Composición lipídica de la leche**

<b>COMPONENTE</b>	<b>CANTIDAD</b>
<b>Lípidos totales</b>	3-5 g/100g de leche
<b>Triglicéridos</b>	97-98 g/100g de grasa
<b>Diglicéridos</b>	0,28-0,59 g/100g de grasa
<b>Monoglicéridos</b>	0,16-0,38 g/100g de grasa
<b>Fosfolípidos</b>	0,2-1 g/100g de grasa
<b>Glucoesfingolípidos</b>	0,01-0,07 g/100g de grasa
<b>Colesterol libre</b>	0,419 g/100g de grasa
<b>Ácidos grasos libres</b>	0,10-0,44 g/100g de grasa

**Fuente: (Jensen, 2002)**

La grasa láctea no ha sido muy apreciada desde el punto de vista funcional debido a que contiene importantes cantidades de ácidos grasos saturados y colesterol. Sin embargo, en la actualidad se conoce que el 60 % de los ácidos grasos presentes en la leche no producen un aumento de los niveles de colesterol sérico, ya que los ácidos grasos C12:0, C14:0 y C16:0 son los que más influencia tienen en su aumento (Schaafsma, 1997). Además en la grasa láctea se han identificado componentes que contribuyen a la salud. Algunos de estos componentes son el CLA y los AGPI *n*-3.

### 1.7.2. El ácido linoleico conjugado

Estos isómeros del ácido linoleico aparecen como microcomponentes en la carne y productos lácteos procedentes de ganado bovino y ovino. Ya que se forman (Figura 13) por acción de una bacteria Gran-negativa, *Butirivibrio fibrisolvens*, presente en el rumen de estos animales que isomeriza el ácido linoleico produciendo mayoritariamente el isómero *cis-9, trans-11*, llamado ruménico, que supone más de 90% del total del CLA en el tejido graso de los rumiantes. Este isómero puede incorporarse a los tejidos o bien ser biohidrogenado a *trans-11*-octadecanoico (ácido vaccénico). Tras su absorción el vaccénico puede almacenarse como tal o ser convertido en *cis-9, trans-11* por incorporación de un doble enlace *cis* en posición 9, gracias a la acción del enzima delta-9 desaturasa presente, en el intestino, en la glándula mamaria y en el tejido adiposo (Moon y col., 2008). En el rumen también puede formarse *trans-10* octadienoico, pero éste no puede ser transformado en los tejidos en *trans-10, cis-12* CLA porque los mamíferos no disponen del enzima delta-12 desaturasa; por ello, las cantidades de este isómero vendrán determinadas por su síntesis en el rumen (Grinari y col., 2000).

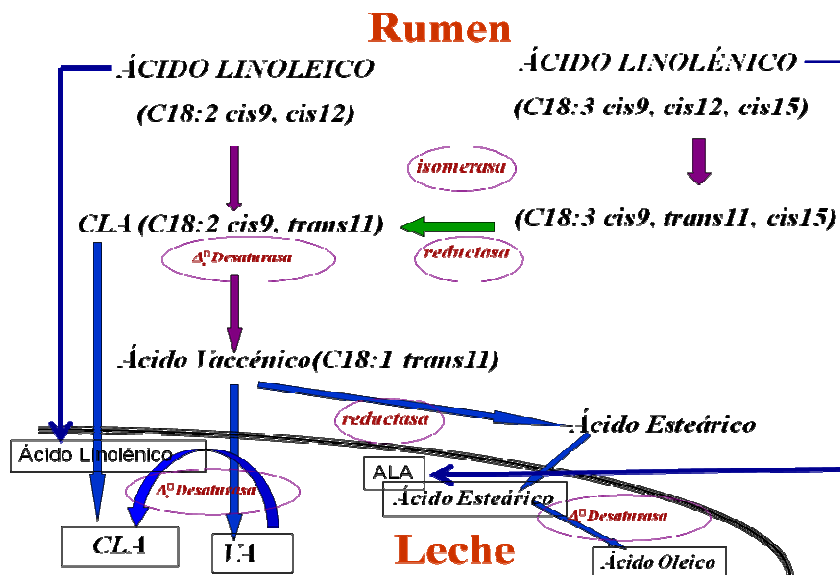


Figura 13. Esquema del metabolismo del ácido linoleico conjugado en el rumen

La grasa láctea contiene entre 5 y 7 mg de CLA/g. También está presente en menor concentración en carne y marisco, mientras que su concentración en aceite vegetal es inferior a 1 mg/g. Es bien sabido que el contenido de CLA en los alimentos

derivados de rumiantes depende más de la dieta del animal y del sistema de producción que de factores relacionados con la fabricación del alimento en sí (Brown y col., 2001). Son varios los factores que influyen en el contenido de CLA de estos alimentos, la dieta del animal, la edad y la raza de los animales, y por factores estacionales (Mir y col., 2004).

A pesar de ser un conjunto de ácidos grasos que presentan disposición *trans*, al contrario que lo normal en los ácidos grasos que presentan esta disposición, no presenta efectos perjudiciales para la salud, sino todo lo contrario. Uno de los primeros efectos que se le han atribuido al CLA es la inhibición de tumores epiteliales en animales de experimentación (Ha y col., 1987). Además, existen distintos estudios que sugieren acciones positivas de los ácidos grasos conjugados sobre la respuesta inmune, el riesgo cardiovascular y la composición corporal, con acciones específicas sobre la reducción del contenido en grasa corporal (Fernández-Quintela y col., 2004).

El más importante de los efectos beneficiosos que se atribuyen a los CLA es el efecto cardioprotector, ya que disminuyen el riesgo de arritmias. Los CLA también inhiben el aumento de la presión vascular en condiciones de hipertensión, especialmente la presión sistólica, e inhibe la agregación plaquetaria, por lo que también se considera que tiene efecto antitrombótico.

Al CLA también se le atribuyen otros efectos beneficiosos sobre la salud, como su efecto anticarcinogénico (Park y col., 1999), antiinflamatorio, y regulador de la respuesta inmune (Pariza, 2004). No obstante, en los últimos años ha sido fruto de una gran atención por parte de la comunidad científica su empleo para la reducción de la grasa corporal. Esta acción, de la cual el isómero *trans*-10, *cis*-12 CLA parece ser el mayor responsable (Park y col., 1999) se produce por la inhibición de las enzimas lipoproteín-lipasas de los adipocitos, por lo que se inhibe el paso de grasa hacia el interior de los adipocitos, mientras que por otra parte aumenta la lipólisis al aumentar el transporte de la grasa hacia las mitocondrias, donde son oxidadas. Por otra parte, los CLA también aumentan la actividad de las enzimas musculares carnitina palmitolin transferasa, las cuales median en el transporte de ácidos grasos de cadena larga a través de las membranas de los miocitos.

Estos efectos parecen ser mediados por dos isómeros de CLA, y los dos isómeros biológicamente activos son el *cis-9, trans-11* y *trans-10, cis-12* (Pariza y col. 2000 y 2001). La mayor parte de los estudios se han llevado a cabo utilizando mezclas de isómeros de CLA y solamente existen algunos datos sobre la actividad biológica de isómeros individuales.

Debido a estas propiedades, estos isómeros han sido potenciados en aquellos alimentos donde de manera natural están en mayor cantidad (carne y leches), e incorporados como fortificantes a otro tipo de alimentos con el fin de lograr propiedades funcionales en los mismos. Estos ácidos grasos son especialmente interesantes como complementos en tratamientos tanto preventivos como terapéuticos de la obesidad, ya que presentan la doble ventaja de que por una parte disminuyen el depósito de grasa en los tejidos adiposos mientras aumentan el tono muscular, además de tener también acción hipolipemiante y cardioprotectora.

### *1.7.3. Métodos de determinación de la composición en ácidos grasos en leche.*

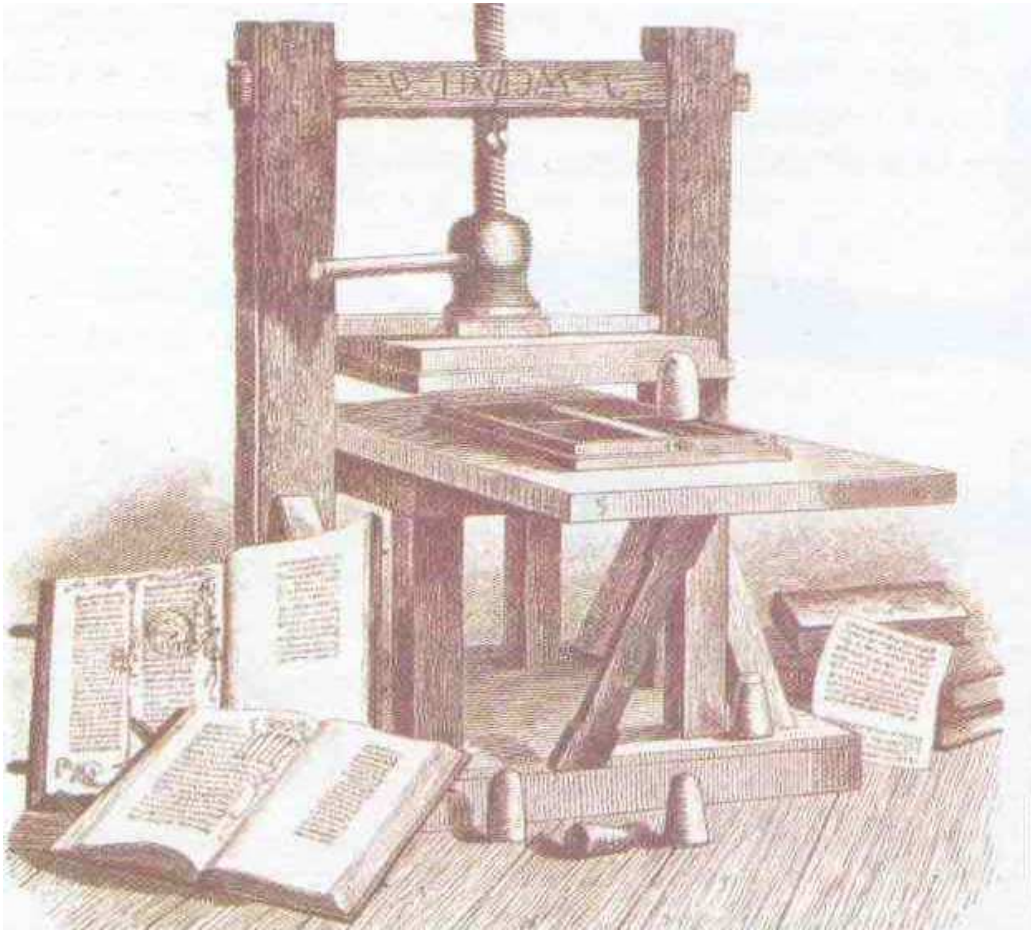
La determinación de ácidos grasos en alimentos se lleva a cabo habitualmente por cromatografía de gases (CG). Los métodos tradicionales empleados para este fin implican la extracción de los lípidos de los alimentos, seguida de un procedimiento de derivatización para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos (FAMES), para finalizar con su determinación mediante CG. La metodología de extracción de los lípidos, propuesta por primera vez por Folch, Lees y Stanley en 1957, utiliza una mezcla de cloroformo-metanol para la extracción de los lípidos totales de los tejidos animales. De la misma forma, los lípidos generalmente son extraídos de la leche, con mezclas de solventes (Jensen y col., 1997).

Sin embargo, los ácidos grasos son compuestos polares y de baja volatilidad que tienden a adherirse a las paredes de las columnas de CG u otras superficies, y por lo tanto, la separación de ácidos grasos no modificados por CG es bastante problemática. Debido a esto es necesario un proceso de derivatización para convertir los ácidos grasos en sus correspondientes ésteres metílicos, que son menos polares, relativamente volátiles y térmicamente estables (Juárez y col., 2008; Rosenfeld, 2002).

En los últimos años, los métodos ISO-IDF 14156 (ISO-IDF, 2001) e ISO-IDF 15884 (ISO-IDF, 2002) han sido adoptados como métodos oficiales para la extracción de lípidos y la obtención de FAMES en muestras de leche. Sin embargo, es sabido que los métodos convencionales utilizados para el análisis de perfiles lipídicos en muchas muestras son poco prácticos, ya que son largos y laboriosos, requieren muestras grandes, y consumen grandes cantidades de solventes (Araujo y col., 2008). Además, la excesiva manipulación de las muestras debida a los múltiples pasos causa pérdidas de la fase lipídica extraída y contaminaciones (Kang y Wang, 2005). Dificultando la posibilidad de expresar los resultados de concentración de los ácidos grasos sobre muestra. Por estas razones, son necesarios métodos rápidos, sencillos, exactos y menos costosos para determinar las concentraciones de ácidos grasos en leche.

El  $H_2SO_4$  ha sido utilizado como catalizador para preparar isopropil ésteres de ácidos grasos en grasa de leche (Wolff y col., 1995; Chardigny y col., 1996), pero algunos investigadores le achacan a este método una excesiva isomerización de los dienos conjugados y la producción de artefactos, lo mismo pasa con el HCl/metanol (Kramer y col., 1997). Sin embargo, aunque todavía no ha sido investigado completamente, el  $H_2SO_4$ /metanol ha dado resultados alentadores en otros estudios (Yamasaki y col., 1999; Luna y col., 2008). De este modo, algunos investigadores han encontrado que la cantidad total de CLA determinada después de una metilación ácida o básica no mostraba diferencias significativas (Lee y Tweed, 2008). Por otro lado, la metilación básica es el procedimiento comúnmente utilizado para desnaturalizar la grasa de leche. Pero este procedimiento requiere condiciones anhidras estrictas (Carvalho y Malcata, 2005). Por esta razón es difícil de aplicar este procedimiento a muestras de leche cruda directamente.





## II. BIBLIOGRAFÍA



**Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN).** 2005. Estrategia para la nutrición, actividad física y prevención de la obesidad (NAOS).

**Albert, C.M., Campos, H., Stampfer, M.J., Ridker, P.M., Manson, J.E., Willett, W.C., Ma, J.** 2002. Blood levels of long-chain *n*-3 fatty acids and the risk of sudden death. *New England Journal of Medicine*. 346, 1113-1118.

**Alvarez, V., Trigo, M., Lois, S., Fernandez, D., Medina, I., Aubourg, S.R.** 2009. Comparative Lipid Composition Study in Farmed and Wild Blackspot Seabream (*Pagellus bogaraveo*). *Czech Journal of Food Science*. 27, S274-S276.

**Araujo, P., Nguyen, T.T., Frøyland, L., Wang, J., Kang, J.X.** 2008. Evaluation of a rapid method for the quantitative analysis of fatty acids in various matrices. *Journal of Chromatography A*. 1212, 106-113.

**Aubourg, S.P., Piñeiro, C., Gallardo, J.M., Barros-Velazquez, J.B.** 2005. Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta máxima*). *Food Chemistry*. 90, 445-452.

**Bang, H.O., Dyerberg, J.** 1972. Plasma lipids and lipoproteins in Greenlandic west coast Eskimos. *Acta Medica Scandinava*. 192 (1-2), 85-94.

**Bang, H.O., Dyerberg, J., Hjoorne, N.** 1976. The composition of food consumed by Greenland Eskimos. *Acta Medica Scandinava*. 200, 69-73.

**Barroso, M., Grande, I.** 2003. Estructura de consumo y alimentación en las dietas atlántica y mediterránea. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2, 416-421.

**Bauchart, D.** 1993. Lipid absorption and transport in ruminants. *Journal of Dairy Science*. 76, 3864-3881.

**Benkouider, C.** 2004. Functional foods: A global overview. *International Food Ingredients*. 5, 66-68.

**Biesalski, H.K.** 2005. Meat as a component of a healthy diet. Are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Science*. 70, 509-524

**Blank, C., Neuman, M.A., Makrides, M., Gibson, R.A.** 2002. Optimizing DHA levels in piglets by lowering the linoleic acid to  $\alpha$ -linolenic acid ratio. *Journal of Lipid Research*. 43, 1537-1543

**Brown, J.M., Halvorsen, Y.D., Lea-Currie, Y.R., Geigerman, C., McIntosh, M.** 2001. *Trans*-10, *cis*-12, but not *cis*-9, *trans*-11, conjugated linoleic acid attenuates lipogenesis in primary cultures of stromal vascular cells from human adipose tissue. *Journal of Nutrition*. 131:2316-2321.

**Busetto, M.L., Moretti, V.M., Moreno-Rojas, J.M., Caprino, F., Giani, I., Malandra, R., Bellagamba, F., Guillou, C.** 2008. Authentication of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*) by fatty acid and isotopic analyses combined with chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 56, 2742-2750.

**Calvani M, Alessandri C, Sopo SM, Panetta V, Pingitore G, Tripodi S, Zappalà, D., Zicari, A.M.** 2006. Consumption of fish, butter and margarine during pregnancy and development of allergic sensitizations in the offspring: role of maternal atopy. *Pediatric Allergy and Immunology*. 17, 94-102.

**Carbajal Azcona, A.** 2005. Evolución del consumo de carne y derivados. Derivados cárnicos funcionales: estrategias y perspectivas. Serie informes. Fundación Española de la Nutrición (FEN). 21- 31.

**Carvalho, A.P., Malcata, F.X.** 2005. Preparation of fatty acid methyl ester for gas-chromatographic analysis of marine lipids: insight studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 53, 5049-5059.

**Chardigny, J.M., Wolff, R.L., Mager, E., Bayard, C.C., Sébédio, J.L., Martine, L., Ratnayake, W.M.N.** 1996. Fatty acid composition of French infant formulas with emphasis on the content and detailed profile of *trans* fatty acids. *Journal of American Oil Chemistry Society*. 73, 1595.

**Cleland, L.G., Gibson, R.A., Pedler, J., James, M.J.** 2005. Paradoxical effect of *n*-3 containing vegetable oils on long-chain *n*-3 fatty acids in rat heart. *Lipids*. 40(10), 995-998.

**Daviglus, M.L., Stamler, J., Orencia, A.J., Dyer, A.R., Liu, K., Greenland, P., Walsh, M.K., Morris, D., Shekelle, R.B.** 1997. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *New England Journal of Medicine*. 336, 1046-1053.

**Debry, G., Pelletier, X.** 1991. Physiological importance of omega-3 omega-6 polyunsaturated fatty-acids in man - an overview of still unresolved and controversial questions. *Experientia*. 47(2), 172-178.

**Decker, E.A., Park, Y.** 2010. Healthier meat products as functional foods. *Meat Science*. 86 (1), 49-55.

**Directiva 90/496/CEE** de 24 de Septiembre de 1990, relativa al etiquetados obre propiedades nutritivas de los productos alimenticios. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas*. 6 Octubre 1990, N° 276, 40-44.

**Dunstan, J.A., Mori, T.A., Barden, A., Beilin, L.J., Taylor, A.L., Holt, P.G., Prescott, S.L.** 2003. Maternal fish oil supplementation in pregnancy reduces

interleukin-13 levels in cord blood of infants at high risk of atopy. *Clinical and Experimental Allergy*. 33, 442-448.

**Enser, M., Hallett, K., Hewett, B., Fursey, G.A.J., Wood, J.D.**, 1996. Fatty acid content and composition of English beef, lamb and pork at retail. *Meat Science*. 42, 443–456.

**Eynard, A.R., López, C.B.** 2003. Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing cancer. *Lipids in Health and Diseases*. 2, 6-10.

**Fernández-Quintela, A., Rodríguez, V.M., Portillo, M.P.** 2004. Ácido linoleico conjugado y grasa corporal. *Revista Española de Obesidad*. 2, 71-79.

**Folch, J., Lees, M., Stanley, G.H.S.** 1957. A single method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226, 497-506.

**Fuentes, A., Fernandez-Segovia, I., Serra, J.A., Barat, J.M.** 2010. Comparison of wild and cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) quality. *Food Chemistry*. 119(4), 1514-1518.

**Fundación Española de la Nutrición (FEN)**. 2007. Valoración de la Dieta Española de acuerdo al Panel de Consumo Alimentario. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino.

**García de Fernando, G.D., Sanz, B.** 1986. Las hamburguesas en la alimentación. Fundación Española De La Nutrición (FEN). Serie informes. 8.

**Gaullier, J.M., Breven, G., Blankson, H., Gudmundsen, O.** 2002. Clinical trial results support a preference for using CLA preparations enriched with two isomers rather than four isomers in human studies. *Lipids*. 37, 1019-1025.

**Gavilán, A.** 2007. G.U.I.D.A.F. (Guía para el diseño de alimentos funcionales). *Revista Alimentaria*. Febrero 2007, 122-125.

**Gessner, J., Wuertz, S., Kirschbaum, F., Wirth, M.** 2008. Biochemical composition of caviar as a tool to discriminate between aquaculture and wild origin. *Journal of Applied Ichthyology*. 24 (Suppl. 1), 52-56.

**Gil, A.** 2004. Metabolismo y actividad biológica de los ácidos grasos omega 3. *Nutrición y Dietética*. 9 (vol.1), 66:74.

**Gil, A.** 2010. Tratado de nutrición, Tomo II. Composición y calidad nutritiva de los alimentos. Ed. Médica panamericana, Madrid.

**Gil, A., Ramírez, M., Gil, M.** 2003. Role of polyunsaturated fatty acids in infant nutrition. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57(supl 1), S31:S34.

**Gil-Campos, M., Dalmau Serra, J.** 2010. Importancia del ácido docosahexaenoico (DHA): funciones y recomendaciones para su ingesta en la infancia. *Anales de Pediatría*. 73, 142.e1-142.e2.

**González Svatetz, C.A., Serra Majem, L.** 2006. *Dieta, Nutrición y Cáncer. Nutrición y salud pública: métodos, bases científicas y aplicaciones*. 2ª ed. Eds. Lluís Serra Majem y Javier Aranceta Bartrina. Elsevier España, Barcelona.

**Grigorakis, K.** 2007. Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: A review. *Aquaculture*. 27, 55-75.

**Griinari, J., Cori, B., Lacy, S., Chouinard, P., Nurmela, K., Bauman, D.** 2000. Conjugated linoleic acid is synthesized endogenously in lactating dairy cows by delta-9 desaturase. *Journal of Nutrition*. 130, 2285-2291.

**Guesnet, P., Alessandri, J.M., Durand, G.** 1993. Métabolisme, fonctions biologiques et importance nutritionnelle des acides gras polyinsaturés. *Cahiers de Nutrition et de Dietétique*. 1, 19-25.

**Innis, S.M.** 1993. Essential fatty acid requirements in human nutrition. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. 71, 699-706.

**International Life Sciences Institute (ILSI).** 1999. Safety assessment and potential health benefits of food components based on selected scientific criteria. ILSI North America Technical Committee on Food Components for Health Promotion. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 39, 203-316.

**International Organization for Standardization-International Dairy Federation (ISO-IDF).** 2001. Milk and milk products-Extraction methods for lipids and liposoluble compounds. International Standard ISO 14156-IDF 172. Brussels: IDF.

**International Organization for Standardization-International Dairy Federation (ISO-IDF).** 2002. Milk fat-preparation of fatty acid methyl esters. International Standard ISO 15884-IDF 182. Brussels: IDF.

**Ha, Y. L., Grimm, N. K., Pariza, M. W.** 1987. Anticarcinogens from fried ground beef: Heat-altered derivatives of linoleic acid. *Carcinogenesis*. 8, 1881-1887.

**Hamazaki, T., Sawazaki, S., Itomura, M., Asaoka, E., Nagao, Y., Nishimura, N., Yazawa, K., Kuwamori, T., Kobayashi, M.** 1996. The effect of

docosahexaenoic acid on aggression in young adults. A placebo-controlled double-blind study. *Journal of Clinical Investigation*. 97(4), 1129-1133.

**He, K., Song, Y., Daviglius, M.L., Liu, K., Van Horn, L., Dyer, A.R., Greenland, P.** 2004. Accumulated evidence on fish consumption and coronary heart disease mortality. A meta-analysis of cohort studies. *Circulation*. 109, 2705-2711.

**Hu, F.B., Bronner, L., Willett, W.C., Stampfer, M.J., Rexrode, K.M., Albert, C.M., Hunter, D., Manson, J.E.** 2002. Fish and omega-3 fatty acid intake and risk of coronary heart disease in women. *Journal of American Medical Association*. 287, 1815-1821.

**Jensen, R.G.** 2002. Invited review: the composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. *Journal of Dairy Science*. 85, 295-350.

**Jensen, R.G., Lammi-Keefe, C.J., Koletzko, B.** 1997. Representative sampling of human milk and the extraction of fat for analysis of environmental lipophilic contaminants. *Toxicology and Environmental Chemistry*. 62, 229-247.

**Jiménez Colmenero, F.** 2007. Healthier lipid formulation approaches in eat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science and Technology*. 18, 567-578.

**Jimenez-Colmenero, F., Carballo, J., Cofrades, S.** 2001. Healthier meat and meat products: Their role as functional foods, *Meat Science* 59, 5–13.

**Juárez, M., Polvillo, O., Contò, M., Ficco, A., Ballico, S., Failla, S.J.** 2008. Comparison of four extraction/methylation analytical methods to measure fatty acid composition by gas chromatography in meat. *Journal of Chromatography A*. 1190, 327-332.

**Kang, J.X., Wang, J.A.** 2005. A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. *BMC Biochemistry*. 6, 5.

**Kaya, Y., Erdem, M.E.** 2009. Seasonal comparison of wild and farmed brown trout (*Salmo trutta forma fario* L., 1758): crude lipid, gonadosomatic index and fatty acids. *International Journal of Food Science and Nutrition*. 60 (5), 413-423.

**Koletzko, B., Uauy, R., Palou, A., Hornstra, G., Eilander, A., Moretti, D., Osendarp, S., Zock, P., Innis, S.** 2010. Dietary intake of eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) in children- a workshop report. *British Journal of Nutrition*. 103, 923-928.

**Kramer, J.K.G., Fellner, V., Dugan, M.E.R., Sauer, F.D., Mossoba, M.M., Yurawecz, M.P.** 1997. Evaluating acid and base catalysts in the methylation of milk

and rumen fatty acids with special emphasis on conjugated dienes and total *trans* fatty acids. *Lipids*. 32, 1219–1228.

**Kris-Etherton, P.M., Harris, W.S., Appel, L.J.** 2002. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation*. 106, 2747-2757.

**Kromhout, D., Bosschieter, E.B., de Lezenne Coulander, C.** 1985. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *New England Journal of Medicine*. 312, 1205-1209.

**Kull, I., Bergstrom, A., Lilja, G., Pershagen, G., Wickman, M.** 2006. Fish consumption during the first year of life and development of allergic diseases during childhood. *Allergy*. 61:1009-1015.

**Lamarche, B.** 2008. Review of the effect of dairy products on non-lipid risk factors for cardiovascular disease. *Journal of the American College of Nutrition*. 27, 741S-746S.

**Lee, M.R.F., Tweed, J.K.S.** 2008. Isomerisation of *cis-9 trans-11* conjugated linoleic acid (CLA) to *trans-9 trans-11* CLA during acidic methylation can be avoided by a rapid base catalysed methylation of milk fat. *Journal of Dairy Research*. 75, 354-356.

**Lien, V.W., Clandinin, M.T.** 2009. Dietary assessment of arachidonic acid and docosahexaenoic acid intake in 4-7 year-old children. *Journal of the American College of Nutritionists*. 28, 7-15.

**Lo, S.K., Tan, C.P., Long, K., Affandi Yusoff, M.S., Lai, O.M.** 2008. Diacylglycerol oil-properties, processes and products: a review. *Food and Bioprocess Technology*. 1, 223-233.

**Luna, P., Juárez, M., de la Fuente, M.A.** 2008. Gas chromatography and silver-ion high-performance liquid chromatography analysis of conjugated linoleic acid isomers in free fatty acid form using sulphuric acid in methanol as catalyst. *Journal of Chromatography A*. 1204, 110-113.

**Mann, N. J., O'Connell, S.L., Baldwin, K.M., Singh, I., Meyer, B.J.** 2010. Effects of Seal Oil and Tuna-Fish Oil on Platelet Parameters and Plasma Lipid Levels in Healthy Subjects. *Lipids*. 45 (8), 669-681.

**Martín Cerdeño, V.J.** 2008. Evolución de los hábitos de compra y consumo en España: 1987-2007, dos décadas del Panel de Consumo Alimentario. *Distribución y Consumo*. 100, 208-239.

**Mata, P., Alonso, R., Mata, N.** 2002. Los omega-3 y omega-9 en la enfermedad cardiovascular. Libro blanco de los omega-3. Instituto Omega3-Puleva Food. Madrid. 49-63.

**Mata, P., Ortega, R.M.** 2003 Omega-3 fatty acids in the prevention and control of cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57 (Suppl. 1), S22-S25.

**Mataix, A., Gil, A.** 2004. Libro blanco de los omega-3. Ediciones Médica Panamericana, Madrid.

**Mataix, J.** 2002. Lípidos alimentarios. Libro blanco de los omega-3. Instituto omega-3-Puleva Food. Madrid. 14:32.

**Mataix, J., Mataix, B., Serra, Ll.** 2001. Aceite de oliva y alimentación mediterránea. En: Mataix y col. Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario. Universidad de Granada. Ediciones Puleva. Granada.

**Menrad, K.** 2003. Market and marketing of functional food in Europe. *Journal of Food Engineering*. 56, 181–188.

**Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (MAPA).** (1992/95/97/2001/02 y 2003). Dirección General de Alimentación. Panel de Consumo Alimentario. La alimentación en España.

**Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM).** (2007) Libro blanco de la pesca.

**Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino (MARM).** (2009). La pesca en España: indicadores.

**Mir, P.S., McAllister, T.A., Scott, S., Aalhus, J., Baron, V., McCartney, D., Charmley, E., Goonewardene, L., Basarab, J., Okine, E., Weselake, R.J., Mir, Z.** 2004. Conjugated linoleic acid-enriched beef production. *American Journal of Clinical Nutrition*. 79, 1207S-1211S.

**Moon, H.S., Lee, H.G., Chung, C.S., Choi, Y.J., Cho, C.S.** 2008. Physico-chemical modifications of conjugated linoleic acid for ruminal protection and oxidative stability. *Nutrition and Metabolism*. 5, 16.

**Moreiras, O., Carbajal, A., Cabrera, L., Cuadrado, C.** 2006. Tablas de composición de alimentos. 10ª Edición. Editorial Pirámides.

**Morimoto, K.C., Van Eenennaam, A.L., Depeters, E.J., Medrano, J.F.** 2005. Hot Topic: Endogenous Production of *n*-3 and *n*-6 Fatty Acids in Mammalian Cells. *Journal of Dairy Science*. 88 (3), 1142-1146.

**Nemets, B., Stahl, Z., Belmaker, R.H.** 2002. Addition of omega-3 fatty acid to maintenance medication treatment for recurrent unipolar depressive disorder. *American Journal of Psychiatry*. 159(3), 477-479.

**Offer, N.W., Marsden, M., Dixon, J., Speake, B.K., Thacker, F.E.** 1999. Effect of dietary fat supplements on levels of n-3 polyunsaturated fatty acids, *trans* acids and conjugated linoleic acid in bovine milk. *Animal Sciences*. 69, 613-625.

**Palanca, V., Rodríguez, E., Señoráns, J., Reglero, G.** 2006. Bases científicas para el desarrollo de productos cárnicos funcionales con actividad biológica combinada. *Nutrición Hospitalaria*. 21(2), 199-202.

**Palou, A., Serra, F., Pico, C.** 2003. General aspects on the assessment of functional foods in the European Union. *European Journal of Clinical Nutrition*. 57, S12-S17.

**Pariza, M.W., Park, Y., Cook, M.E.** 2000. Mechanisms of action of conjugated linoleic acid: evidence and speculation. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 223, 8-13.

**Pariza, M.W., Park, Y., Cook, M.E.** 2001. The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog Lipid Res*. 40, 283-298.

**Pariza, M. W.** 2004. Perspective on the safety and effectiveness of conjugated linoleic acid. *American Journal Clinical of Nutrition*. 79, 1132S-1136S.

**Park, Y., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W., Pariza, M.W.** 1999. Evidence that the *trans*-10,*cis*-12 isomer of conjugated linoleic induces body composition changes in mince. *Lipids*. 34, 235-241.

**Pascal, G.** 1996. Functional foods in the European Union. *Nutritional Reviews*. 25 (supl. 1), S29-S32.

**Paul, A.A. y Southgate, D.A.T.** 1979. *The composition of Foods*. 4ª ed. McCance y Widdowson's eds. Elsevier, Londres.

**Peet, M., Murphy, B., Shay, J., Horrobin, D.** 1998. Depletion of omega-3 fatty acid levels in red blood cell membranes of depressive patients. *Biological Psychiatry*. 43(5), 315-319.

**Qiu, X.** 2003. Biosynthesis of docosahexaenoic acid (DHA, 22:6-4,7,10,13,16,19): two distinct pathways. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 68(2), 181-186.

**Reglamento (CE) 1924/2006** de 20 de Diciembre de 2006, relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea. 30 Diciembre 2006, N° 404, 9-25.

**Reglamento (CE) 1925/2006** de 20 de Diciembre de 2006, sobre la adición de vitaminas, minerales y otras sustancias determinadas a los alimentos. Diario Oficial de la Unión Europea. 30 Diciembre 2006, N° 404, 26-38.

**Reglamento (CE) 116/2010** de 9 de Febrero de 2010 por el que se modifica el Reglamento (CE) N° 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. Diario Oficial de la Unión Europea. 10 Febrero 2010, N° 37, 16-18.

**Riediger, N.D., Othman, R.A., Suh, M., Moghadasian, M.H.** 2009. A systematic review of the roles of *n*-3 fatty acids in health and disease. *Journal of the American Dietetic Association*. 109, 668-679.

**Rosenfeld, J.M.** 2002. Application of analytical derivatizations to the quantitative and qualitative determination of fatty acids. *Analytical Chimica Acta*. 465, 93-100.

**Sánchez-Muñiz, F. J.** 2005. Nuevos alimentos. Realidad y perspectivas de la carne y sus derivados como alimentos funcionales. Derivados cárnicos funcionales: estrategias y perspectivas. Serie informes. Fundación Española De La Nutrición (FEN); 65-76.

**Schaafsma, G.** 1997. The Western diet with a special focus on Dairy products. Brussels, Belgium: Institute Danone. Danone Chair Monographs. 4, 69-79.

**Simopoulos, A.P.** 2008. The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Experimental Biology and Medicine*. 233(6), 674-688.

**Siscovick, D.S., Raghunathan, T.E., King, I., Weinmann, S., Wicklund, K.G., Albright, J., Bovbjerg, V., Arbogast, P., Smith, H., Kushi, L.H., et al.** 1995. Dietary intake and cell membrane levels of long-chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of primary cardiac arrest. *Journal of the American Medical Association*. 274, 1363-1367.

**Steinhart, H., Rickert, R., Winkler, K.** 2003. Identification and analysis of conjugated linoleic acid isomers (CLA). *European Journal of Medical Research*. 8: 370-372.

**Stoll, A., Severus, W., Freeman, M., Rueter, S., Zboyan, H.A., Diamond, E., Cress, K.K., Marangell, L.B.** 1999. Omega 3 fatty acids in bipolar disorder: a preliminary double-blind, placebo-controlled trial. *Archives of General Psychiatry*. 56:407–412.

**Trautwein, E.A.** 2001. *n*-3 fatty acids-physiological and technical aspects for their use in food. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 103, 45-55.

**Ulbricht, T.L.V. Southgate, D.A.T.** 1991. Coronary heart disease: seven dietary factors. *The Lancet*. 228, 985-992.

**Urrialde, R.** 2006. Alegaciones nutricionales y de salud diferenciación y autorización. Libro de Abstracts: Alimentos funcionales y salud ¿serán necesarios en el futuro?. Ediciones Diputación de Lugo.251-255.

**Valenzuela, A., Morgano, N.** 1999. *Trans* fatty acid isomers in human health and in the food industry. *Biological Research*. 32, 273-287.

**Wahle, K.W.J., Sheys, S.D., Rotondo, D.** 2004. Conjugated linoleic acids: are they beneficial or detrimental to health? *Progress in Lipid Research*. 43, 553-587.

**Wallis, J.G., Watts, J.L., Browse, J.** 2002. Polyunsaturated fatty acid synthesis: what will they think of next? *Trends in Biochemical Sciences*. 27 (9), 467-473.

**Whitney, E.N., Rolfes, S.R.** 2002. *Understanding nutrition* (Ninth ed), Wadsworth, Belmont, CA.

**Wood, J.D., Enser, M., Fisher, A.V., Nute, G.R., Sheard, P.R., Richardson, R.I., Hughes S.I., Whittington, F.M.** 2008. Fat deposition fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science*, 78, 343-358.

**Woods, V.B., Fearon, A.M.** 2009. Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livestock Science*. 126, 1-20.

**Wolff, R.L., Bayard, C.C., Fabien, R.J.** 1995. Evaluation of sequential methods for the determination of butterfat fatty acid composition with emphasis on *trans*-18/1 acids—application to the study of seasonal variations in French butters. *Journal of American Oil Chemists 'Society*. 72, 1471.

**Yamasaki, M., Kishihara, K., Ikeda, I., Sugano, M., Yamada, K.** 1999. A recommended esterification method for gas chromatographic measurement of conjugated linoleic acid. *Journal of American Oil Chemists 'Society*. 76 (8), 933-938.



### III.OBJETIVOS



### **3.1. Objetivo general**

Diseñar alimentos funcionales de origen animal a través de la modificación de su perfil lipídico, así como establecer herramientas para resolver las problemáticas que surgen durante el diseño de estos alimentos.

### **3.2. Objetivos específicos**

1. Desarrollar una hamburguesa modificada con niveles más bajos de grasa y sodio que los productos convencionales y con un perfil lipídico más adecuado a las recomendaciones nutricionales. Además el producto desarrollado debe ser aceptable por el consumidor, estable durante un tiempo razonable de vida útil y debe mantener sus propiedades nutricionales durante el cocinado.
2. Evaluar el uso de transglutaminasa y caseinato para mejorar las propiedades de la textura en pasteles de carne de ternera con menos grasa y con fibra dietética añadida.
3. Determinar la composición proximal, el perfil de ácidos grasos y la composición en minerales traza del rodaballo de cultivo y del rodaballo salvaje, y evaluar sus posibles diferencias.
4. Desarrollar un método sencillo de extracción-derivatización antes del análisis por cromatografía de gases, para la determinación cuantitativa de la composición en ácidos grasos en leche.





## **IV.RESULTADOS Y DISCUSIÓN**





**4.1. Desarrollo de una hamburguesa con formulación lipídica más sana y estudio de sus propiedades nutricionales, sensoriales y de estabilidad.**

**Development of a hamburger patty with healthier lipid formulation and study of its nutritional, sensory and stability properties.**

Beatriz Martínez, Jose M. Miranda, Beatriz I. Vázquez, Cristina A. Fente, Carlos M.

Franco, Jose L. Rodríguez, Alberto Cepeda

Food and Bioprocess Technology, DOI 10.1007/s11947-009-0268-x



## Resumen

En el presente trabajo se ha desarrollado, utilizando procesos tecnológicos, una nueva hamburguesa de ternera enriquecida en AGPI *n*-3 y  $\alpha$ -tocoferol.

La carne utilizada para la fabricación se obtuvo de piezas cárnicas de ternera de bajo costo, que son las utilizadas habitualmente para la fabricación de hamburguesas, que procedían de animales de menos de 12 meses de edad. La grasa visible y el tejido conjuntivo de las mismas fueron eliminados manualmente y sustituidos por una mezcla de aceites pre-emulsionados de oliva, maíz y aceite de hígado de bacalao desodorizado.

El producto desarrollado fue analizado, determinándose su composición proximal y el perfil de ácidos grasos, así como su aceptabilidad por parte de los consumidores. Los valores obtenidos de estos parámetros fueron comparados con valores obtenidos para hamburguesas convencionales de ternera.

Para el producto desarrollado, se estudiaron además los efectos del cocinado sobre su perfil lipídico y sobre su contenido de grasa total, para comprobar que sus potenciales cualidades saludables no se modifican con el tratamiento térmico. También se evaluó la oxidación lipídica y la estabilidad del color superficial de las hamburguesas desarrolladas, durante 8 días de almacenamiento refrigerado a 2° C, utilizando un envasado en atmósfera modificada con unas proporciones de 20/80% de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>.

El producto desarrollado mostró contenidos significativamente más bajos de grasa, colesterol, sodio y calorías que las hamburguesas de ternera fabricadas utilizando procedimientos convencionales. Además, el producto modificado mostró un perfil apreciablemente diferente de ácidos grasos, y como resultado un valor nutricional diferente. Los valores de ácidos grasos poliinsaturados, ácidos grasos saturados y la proporción *n*-6/*n*-3 del producto obtenido, se aproximan más a las recomendaciones nutricionales que los de los productos tradicionales.

No se encontró evidencia alguna de oxidación lipídica para las hamburguesas modificadas durante el período de almacenamiento de 8 días, y el color de superficial, especialmente el rojo, fue más estable que para las convencionales. Adicionalmente, la aceptabilidad de los consumidores con respecto a la hamburguesa desarrollada, una vez

cocinada, fue buena, obteniendo puntuaciones estadísticamente similares a los productos convencionales.

La hamburguesa modificada desarrollada por métodos tecnológicos es viable y puede ser considerado un alimento útil para impedir desórdenes nutricionales o para ser incluida en regímenes nutricionales como sustituto de otros productos cárnicos.

## Development of a Hamburger Patty with Healthier Lipid Formulation and Study of its Nutritional, Sensory, and Stability Properties

Beatriz Martínez · Jose M. Miranda · Beatriz I. Vázquez · Cristina A. Fente · Carlos M. Franco · Jose L. Rodríguez · Alberto Cepeda

Received: 15 May 2009 / Accepted: 8 September 2009  
© Springer Science + Business Media, LLC 2009

**Abstract** A modified beef hamburger patty enriched in polyunsaturated  $n-3$  fatty acids and  $\alpha$ -tocopherol was developed using technological procedures. Raw meat was obtained from low-cost parts of beef carcasses (brisket and flank) to which visible fat and connective tissue was manually eliminated and substituted by a mixture of pre-emulsified olive, corn, and deodorized fish oil. The developed product was analyzed and compared to conventional beef hamburger patties for their proximate composition, fatty acid profile, and consumer acceptability. The effects of cooking on the fat content and fatty acid profile of the developed product were investigated. Additionally, the lipid oxidation and surface color stability of modified and conventional hamburgers were investigated during 8 days of refrigerated storage while packaged in a modified atmosphere (20%/80%  $\text{CO}_2/\text{O}_2$ ) and subsequently cooking. The developed product showed significantly lower total fat, cholesterol, sodium, and calorie content than beef hamburger patties manufactured using conventional procedures. In addition, the polyunsaturated fatty acids/saturated fatty

acids and  $n-6/n-3$  ratios matched nutritional recommendations more closely. No evidence of lipid oxidation was found for the modified hamburger patties during 8-day storage period, and surface color, especially redness, was more stable than in conventional ones. Additionally, consumer acceptability of the developed patty after it was cooked was acceptable and similar to that of conventional products. The modified hamburger patty developed by technological methods is viable and can be considered a useful food to preclude nutritional disorders or to assist in nutritional regimens.

**Keywords** Hamburger · Patty · Meat product · Beef · Fatty acid · Modified atmosphere ·  $\alpha$ -Tocopherol · Healthy food

### Introduction

Human nutrition in Western developed countries is characterized by an excessive consumption of energy, saturated fatty acids (SFA),  $n-6$  polyunsaturated fatty acids (PUFAs), and sodium. At the same time, however, consumption is also characterized by a marked deficiency in  $n-3$  PUFAs and antioxidants (Mata and Ortega 2003).

These tendencies in the typical human diet in developed countries are an important reason for the increased incidence of obesity, which has risen at an alarming rate (Lo et al. 2008), as well as chronic and degenerative illness. In particular, cardiovascular diseases are often caused or exacerbated by a high consumption of  $n-6$  PUFAs and sodium, and a low consumption of  $n-3$  PUFAs (WHO 2003). In order to improve the health of the general population, scientific authorities and nutritional organizations (Simopoulos et al. 1999; WHO 2003) have proposed recommendations for optimal nutritional intake: dietary fat

Sources of support in the form of grants: ASOGACARNE and Xunta de Galicia (project PGIDIT05TAL019E)

B. Martínez · J. M. Miranda · B. I. Vázquez · C. A. Fente · C. M. Franco (✉) · A. Cepeda  
Laboratorio de Higiene Inspección y Control de Alimentos, Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Veterinaria pabellón 4 p.b., Campus Universitario, 27002 Lugo, Spain  
e-mail: carlos.franco@usc.es

J. L. Rodríguez  
Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario, 27002 Lugo, Spain

Published online: 25 September 2009

 Springer

burgers were manufactured by two different local meat factories using similar meat to that used in the development of the modified hamburger patty but without removing visible fat and connective tissue. Two lots of 30 hamburger patties were manufactured on different days by each meat factory, and were elaborated using as ingredients: beef, rice, corn, potatoes, garlic, salt, dextrose, spices, soybean protein, sodium citrate, sodium ascorbate, sodium sulfite, and potassium metabisulfite (conventional 1); and beef, grated bread, dextrose, spices, potassium metabisulfite, and sodium ascorbate (conventional 2).

#### Proximate, Cholesterol, and Fatty Acid Profile Analysis

One sample from each lot of both modified and conventional hamburger patties was processed in triplicate ( $n=12$ ). The quantities of protein (AOAC 981.10), moisture (AOAC 950.46), ash (AOAC 920.153), total fat (AOAC 991.36), and sodium (AOAC 969.23) were analyzed following AOAC (2002) procedures. Carbohydrates and energy content were determined according to the procedure recommended by Allison and Senti (1983).

Cholesterol content was analyzed using gas chromatography (GC), following the procedure described by Esmaeel et al. (1994). A Carlo Erba MFC500 gas chromatograph equipped with a BPX5 capillary column (30 m $\times$ 0.32 mm i.d. and 0.25  $\mu$ m film thickness) was used. The oven was heated with a temperature ramp of 180–280 °C. The temperatures of the injection port and the detector were 290 and 300 °C, respectively. Cholesterol was identified by comparing its retention time with that of a cholesterol standard (Sigma, St. Louis, MO, USA). Quantification was conducted using 5 $\alpha$ -cholestane (Sigma) as an internal standard that was added to the sample as a solution (2 mg/ml) prior to the extraction procedure.

The fatty acid content was determined based on a lipid extract obtained by the Bligh and Dyer (1959) method. The fatty acid composition was determined using gas chromatography. Boron trifluoride/methanol was used to separate fatty acid methyl esters (Morrison and Smith 1964), which were finally dissolved in hexane. A Hewlett-Packard 6890 Series gas chromatograph fitted with capillary column DB-WAX (30 m $\times$ 0.25 mm i.d. and 0.25  $\mu$ m film thickness) and flame ionization detection was used. The sample volume (1  $\mu$ l) was injected under the following GC conditions: the temperatures of the injection port and the detector were 230 and 250 °C, respectively. The oven temperature was increased to 60 °C and held at that level for 2 min before being increased to 160 °C at a rate of 50 °C/min. The temperature was then held at that level for 2 min before being increased to 170 °C at 1.5 °C/min, then to 185 °C at a rate of 2 °C/min, and finally to 240 °C at 3 °C/min, where it was held for 10 min. The carrier gas was hydrogen, at a rate

of 1.7 ml/min. The methyl esters of fatty acids were identified by comparing the retention times of the peaks in the sample with those of standard pure methyl esters standards run previously (Sigma). Tricosanoic acid (C23:0) (Sigma) was used as an internal standard. Fatty acid methyl esters were expressed as a percentage of the total methyl ester content.

#### Consumer Acceptability

All samples were cooked according to the recommendations of the American Meat Science Association (1995). Samples were flipped every 2 min and grilled at 165 °C, for a total of 8 min, to an internal temperature of 70–75 °C, as determined using a thermometer. Samples were kept at 25 °C until sensory analyses.

Consumer acceptability of the developed hamburger patties was compared with conventional beef hamburger patties using a hedonic test. The panel consisted of 42 panelists that included collaborators and students of the Department of Food Hygiene, Inspection and Control that like or usually consume beef hamburgers ( $n=42$ ). Sessions took place in a sensory evaluation laboratory equipped with individual assessment booths and uniform lighting conditions.

The hamburger patties were cooked as previously described. Immediately after cooking, each sample was coded, cut into quarters, and served to the panelists in a random order. Each panelist received one-quarter portions of the developed hamburger patty and two conventional beef hamburger patties. Panel members were asked to record their opinions regarding the odor, taste, texture, juiciness, and overall acceptability of the hamburger patties. These attributes were evaluated based on a 7-point hedonic scale, in which 7 represented an extreme like and 1 represented an extreme dislike. Spring water and unsalted bread were provided so that the panelists could clean their mouths between samples.

#### Packaging, Storage, and Determination of Stability of Samples

The developed and conventional hamburger patties were placed individually in polyurethane trays and were packed in a 20%/80% CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> modified atmosphere, since a modified atmosphere with a high level of oxygen is increasingly being used in meat packaging (Jakobsen and Bertelsen 2000). Trays were evacuated and flushed with the selected gas mixture (Carbuos Metálicos, S.A., Barcelona, Spain) using with a D-5810 gas mixer (Witt-Gasetechnik GmbH & Co. KG, Witten, Germany). The samples were closed by heat sealing with a Vac-210 packing machine (Guasch, Barcelona, Spain) and a high

barrier film made of polyamide/polyethylene. Packages had a headspace volume ratio of 1:1. The gas content of packs was controlled using a 1450 B3 Sermovex gas analyzer (Aries, Madrid, Spain). Once the samples were packaged, all hamburger patties were stored at 2 °C until the time of analysis. The stability of the developed product was measured during 8 days of refrigerated storage and subsequently cooking by means of lipid oxidation and surface color.

Lipid oxidation of the hamburger patties was determined using the 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method described by Rosmini et al. (1995). Samples of 2 g each were introduced into centrifuge tubes, 1 ml of ultrapure water was incorporated, and the tubes were stirred for 5 min with a Vibramix vortex stirrer (Ovan, Barcelona, Spain). Subsequently, 10 ml of 10% of trichloroacetic acid (TCA) solution was added and the tubes were stirred again for 5 min. At the end of this time, 5 ml of thiobarbituric acid (TBA) solution was added to each tube and stirred for 2 min. The tubes were then centrifuged for 5 min at 3,500 rpm in an H-103N centrifuge (Kokusan, Tokyo, Japan). The liquid phase was filtered through Whatman No. 1 filter papers into assay tubes. Later, the tubes were placed in a thermostatic water bath for 35 min at 100 °C. The tubes were cooled, and the TBARS were recorded at 532 nm using a Novaspec Plus spectrophotometer (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK). Calibration curves were prepared using 1,1,3,3-tetramethoxypropane standard working solutions. The blank consisted of 1 ml of ultrapure H<sub>2</sub>O combined with 10 ml of 10% aqueous TCA and 5 ml of 0.02 M TBA. Results were expressed as milligrams of malondialdehyde per kilogram of sample.

Color measurements of the hamburger patties' surface were conducted on samples instantly after opening of each pack. In the case of cooked hamburgers, samples were tempered at room temperature (20–25 °C) until measurement. Samples were covered with a polyethylene film with pressure to obtain a uniform, bubble-free surface. A Minolta Chroma Meter CR300 (Minolta Corporation, Ramsey, NJ, USA), adjusted by a Minolta adjust plate, no. 21733001 ( $Y=92.6$ ;  $x=0.3136$ ;  $y=0.3196$ ) was used to obtain the reflectance spectra from 400 to 700 nm using an integrating sphere. The illuminant used was D65 and the standard observer position was 10°. Color results were obtained in the CIE-LAB system and the lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ , red↔green), and yellowness ( $b^*$ , yellow↔blue) were calculated.

Both lipid oxidation and color parameters were determined for the developed and conventional hamburger patties before packaging (day 0) as well as in days 1, 3, 5, and 8 of packaging, and in cooked hamburgers in one sample of each lot in triplicate ( $n=12$ ).

#### Statistical Analysis

A Student's  $t$  test was used to identify any differences that existed in the proximate composition, cholesterol content, fatty acid profile, and sensory evaluation between the modified and conventional hamburger patties, as well as between the fat content and fatty acid profile of raw and cooked modified burger patties. The significance of days of storage, cooking, and hamburger patty type on TBARS and surface color parameters was statistically analyzed using a one-way analysis of variance and post hoc analyses were conducted using Tukey's tests. Differences were considered significant for  $P<0.05$ . Data analyses were conducted using the statistical package SPSS 13.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

#### Results and Discussion

The proximate composition and the sodium and cholesterol content of the developed and conventional products are shown in Table 1. The modified hamburger patty showed a significantly higher amount of protein and lower fat, calorie, sodium, and cholesterol content with respect to conventional beef hamburger patties. The higher level of protein as well as the lower level of fat and cholesterol in the developed product is related to the elimination of visible fat and connective tissue from the meat, whereas the reduction in sodium content is related to the partial substitution of NaCl by KCl. Since fat is the most important component of the calorie content, a reduction in caloric content in the modified product is observed as a consequence of the decrease in its fat content. Thus, the developed product follows nutritionists' recommendations more closely than conventional products, which is important because sodium, fat, and calories are important risk factors related to cardiovascular diseases when they are consumed excessively (WHO 2003).

A major concern in the development of reformulated meat products is the loss of the specific components during the processing and cooking of the products, since this can limit their potential health benefits (Jiménez-Colmenero 2007). Based on the composition of the modified hamburger patty, the fat content was expected to be approximately 9 g/100 g, whereas chemical analysis revealed that its fat content reached 8.36 g/100 g of final product. Thus, only about 7% of the oils employed in the reformulation were lost during the manufacturing of the product. As was reported previously, oil pre-emulsion in a protein matrix technology reduces the chances of bulk oil physically separating from the structure of the meat product so that it remains stable throughout the conditions that are encountered during processing, storage, and consumption

**Table 1** Proximate composition and sodium and cholesterol content of modified and conventional raw hamburger patties

	Modified (n=12)	Conventional (n=12)	Significance
Dry matter (g/100 g)	30.94±1.57	32.78±1.43	ns
Fat (g/100 g)	8.36±0.66	14.12±1.09	***
Protein (g/100 g)	19.86±0.56	16.23±0.69	**
Carbohydrates (g/100 g)	1.27±0.35	1.12±0.47	ns
Ash (g/100 g)	1.45±0.31	1.31±0.56	ns
Calories (kcal/100 g)	159.76±2.09	196.52±2.81	***
Sodium (mg/100 g)	279.12±1.75	551.23±7.92	***
Cholesterol (mg/100 g)	16.1±1.75	58.1±1.42	***

Results are expressed as means ± standard deviations  
 ns not significant ( $P>0.05$ )  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  
 \*\*\* $P < 0.001$

(Jiménez-Colmenero 2007). Also, oil-in-water emulsions are easier to disperse into water-based systems such as muscle foods and reduces the losses of the oils employed in the reformulation during the manufacturing of the product (Djordjevic et al. 2004).

The differences in the fatty acid profiles of developed and conventional hamburger patties are shown in Table 2. Although the fatty acid composition of beef fat depends on a number of factors, such as the amount of fat in the carcass, or the diet and breed of the cattle (Hur et al. 2008; Wood et al. 2008), it was reported that the predominant SFAs are myristic, palmitic, and stearic acids in beef fat; that linoleic acid is the main PUFA; and that oleic acid is the more predominant MUFA (Scollan et al. 2006). The

fatty acid profile of the conventional hamburger patties analyzed in the study was in agreement with these reported data. However, the modified product showed a significantly different fatty acid profile and, as a consequence, a different nutritional value with respect to conventional hamburger patties. The main differences were the lower relative contents of SFA fraction in the modified products, mainly attributed to the presence of higher levels of palmitic (30.34 mg/100 mg of total fatty acids) and stearic (21.18 mg/100 mg of total fatty acids) acids in conventional products and the higher MUFA and PUFA fractions in the developed hamburger patties. The higher MUFA fraction in the modified products was due to the increase in oleic acid present in the developed product (43.56 mg/100 mg of total

**Table 2** Fatty acid profile (mg/100 mg of total fatty acids) of modified and conventional hamburger patties

	Modified (n=12)	Conventional (n=12)	Significance
Myristic C14:0	1.84±0.05	4.77±0.12	***
Pentadecanoic C15:0	0.23±0.01	0.58±0.01	***
Palmitic C16:0	18.88±0.10	30.34±0.43	***
Heptadecanoic C17:0	0.62±0.04	1.74±0.03	***
Stearic C18:0	8.34±0.53	21.18±0.40	***
∑SFA	29.92±0.62	60.28±0.88	***
Myristolenic C14:1 (n-5)	0.32±0.01	0.46±0.02	***
Palmitoleic C16:1 (n-7)	2.80±0.06	2.1±0.10	***
Heptadecanoic C17:1 (n-9)	0.43±0.02	0.45±0.04	ns
Oleic C18:1 (n-9)	43.56±0.62	23.77±1.05	***
Vaccenic C18:1 (n-7)	2.56±0.17	9.06±0.28	***
Gadoleic C20:1 (n-9)	0.53±0.18	0.00±0.00	***
∑MUFA	50.09±0.58	35.83±0.82	***
Linoleic C18:2 (n-6)	12.71±0.41	3.38±0.36	***
Linolenic C18:3 (n-3)	0.61±0.03	0.00±0.00	***
Arachidonic C20:4 (n-6)	0.86±0.1	0.00±0.00	***
Eicosapentaenoic C20:5 (n-3)	2.57±0.13	0.50±0.06	***
Docosapentaenoic C22:5 (n-3)	0.59±0.04	0.00±0.00	***
Docosahexaenoic C22:6 (n-3)	2.58±0.07	0.00±0.00	***
∑PUFA	19.89±0.69	3.89±0.33	***
PUFA/SFA	0.66±0.03	0.06±0.01	***
MUFA+PUFA/SFA	2.34±0.04	0.66±0.05	***
n-6/n-3	2.14±0.12	6.76±0.51	***

Results are expressed as means ± standard deviations  
 ns not significant ( $P>0.05$ )  
 \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ,  
 \*\*\* $P < 0.001$

fatty acids vs. 23.77 mg/100 mg of total fatty acids in conventional product). This increase in oleic acid can be attributed to the addition of olive oil, since it is an excellent source of oleic acid (American Dietetic Association, ADA, 2007). With respect to the PUFA fraction, the higher amount in the developed product is likely due to the addition of corn and deodorized fish oil. Corn oil is an excellent source of linoleic acid (ADA 2007), which amounted to 12.71 mg/100 mg of the total fatty acids in the modified product vs. 3.38 mg/100 mg of the total fatty acids in the conventional product. The inclusion of deodorized fish oil in the modified hamburger patty formulation was likewise responsible for the high levels of *n*-3 fatty acids such as eicosapentaenoic (EPA) (2.57 vs. 0.52 mg/100 mg of total fatty acids in the conventional product) or docosahexaenoic (DHA) (2.58 vs. 0 mg/100 mg of total fatty acids in the conventional product). Thus, the ratio of PUFA/SFA was 0.66 in the modified product, which falls within the recommended ratio of 0.4 to 1 (Wood et al. 2008). In conventional products, this ratio was just 0.06, slightly below the ratio of approximately 0.1 reported by other authors (Scollan et al. 2006; Wood et al. 2008).

Furthermore, the *n*-6/*n*-3 ratio was 2.14 in modified products instead of 6.76 in control patties. This value should not exceed 4, according to nutritionists' recommendations (Simopoulos 2002; Jiménez-Colmenero 2007).

One fundamental requirement of the design of healthy enriched foodstuffs is to ensure that the final product contains high enough concentrations of the potentially beneficial compounds so that the proper amounts will be included in the quantity of the product that a person can reasonably be expected to consume. An average portion of the modified hamburger patties, which can be estimated at 100–150 g, would supply about 50–75% of the adequate *n*-3 fatty acid intake for DHA and EPA, established as 0.65 g/day, reaching the minimum of 0.22 g recommended for each of these fatty acids (Simopoulos et al. 1999).

During the cooking procedure (Table 3), significant increases were observed in the dry matter and fat content of the modified product. Nevertheless, the relationship between fat and dry matter revealed that no changes in total fat content were observed when the moisture loss occurring during the cooking procedure is taken into account. It is well known that the composite fatty acids of meat melt

**Table 3** Effects of cooking on the total fat, dry matter, and fatty acid profile (mg/100 mg of total fatty acids) of modified hamburger patties

	Crude ( <i>n</i> =12)	Cooked ( <i>n</i> =12)	Significance
Total fat (%)	8.36±0.66	9.61±0.72	***
Dry matter	30.94±1.57	38.14±2.5	***
Fat/dry matter	27.02±1.11	26.11±0.87	ns
Fatty acids			
Myristic C14:0	1.83±0.05	1.83±0.09	ns
Pentadecanoic C15:0	0.22±0.01	0.25±0.02	ns
Palmitic C16:0	18.78±0.1	19.02±0.33	ns
Heptadecanoic C17:0	0.62±0.04	0.65±0.05	ns
Stearic C18:0	8.34±0.53	8.38±0.24	ns
∑SFA	29.92±0.62	30.14±0.59	ns
Myristolenic C14:1 ( <i>n</i> -5)	0.32±0.01	0.46±0.27	***
Palmitoleic C16:1 ( <i>n</i> -7)	2.80±0.06	2.78±0.08	ns
Heptadecanoic C17:1 ( <i>n</i> -9)	0.43±0.02	0.43±0.04	ns
Oleic C18:1 ( <i>n</i> -9)	43.56±0.62	43.48±0.52	ns
Vaccenic C18:1 ( <i>n</i> -7)	2.56±0.17	2.58±0.32	ns
Gadoleic C20:1 ( <i>n</i> -9)	0.53±0.18	0.52±0.03	ns
∑MUFA	50.09±0.58	50.16±0.76	ns
Linoleic C18:2 ( <i>n</i> -6)	12.71±0.41	12.66±0.16	ns
Linolenic C18:3 ( <i>n</i> -3)	0.61±0.03	0.64±0.02	ns
Arachidonic C20:4 ( <i>n</i> -6)	0.86±0.1	0.93±0.06	**
Eicosapentaenoic C20:5 ( <i>n</i> -3)	2.57±0.13	2.54±0.07	ns
Docosapentaenoic C22:5 ( <i>n</i> -3)	0.59±0.04	0.65±0.14	**
Docosahexaenoic C22:6 ( <i>n</i> -3)	2.58±0.07	2.56±0.05	ns
∑PUFA	19.89±0.69	19.99±0.35	ns
PUFA/SFA	0.66±0.03	0.66±0.02	ns
MUFA+PUFA/SFA	2.34±0.04	2.32±0.02	ns
<i>n</i> -6/ <i>n</i> -3	2.14±0.12	2.13±0.08	ns

Results are expressed as means ± standard deviations

ns not significant ( $P>0.05$ )

\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ,

\*\*\* $P<0.001$

**Table 4** Comparison of the acceptability of modified and conventional hamburger patties as rated by consumers

	Modified (n=42)	Conventional 1 (n=42)	Conventional 2 (n=42)
Odor	4.92±1.17	5.03±1.34	4.96±1.08
Taste	4.87±0.79	5.11±0.73	5.03±.50
Texture	4.28±1.33	4.89±1.17	4.86±1.51
Juiciness	5.19±0.82a	4.98±1.03a,b	4.76±0.72b
Overall acceptability	4.85±1.42	5.04±1.19	4.94±1.42

Results are expressed as means ± standard deviations. Values rated on a 7-point scale where 7 represented an extreme like and 1 represented an extreme dislike. Means of the same row with different letters are significantly different ( $P<0.05$ )

between about 25 and 50 °C, with SFAs melting at higher and PUFAs at lower temperatures (Wood et al. 2008), and that oil incorporated into restructured meat products tends to liquefy and be lost during cooking (Jiménez-Colmenero 2007). In contrast to conclusions reported by other authors (Lee et al. 2006), our work observed no significant differences in the  $n-3$  PUFAs or in the fatty acid profiles of crude and cooked modified hamburger patties. The only exceptions to this were the myristolenic, arachidonic, and docosapentaenoic fatty acids. Cooked hamburger patties showed higher amounts of these four fatty acids than the crude products. However, in the final product, all of these fatty acids amounted to less than 1% of total fatty acids. Since the  $\Sigma$ SFA,  $\Sigma$ MUFA,  $\Sigma$ PUFA, PUFA/SFA, MUFA+PUFA/SFA, and  $n-6/n-3$  ratios were not significantly affected by the cooking procedure, it can be concluded that the nutritional quality of the product is not significantly modified during the cooking process.

An important limiting factor for introducing fish oil into foodstuffs in order to contribute  $n-3$  fatty acids is the negative effect on sensory characteristics (Garg et al. 2006). This problem was previously reported by other authors (Muguerza et al. 2001; Park et al. 1989). In the hamburger

patty developed in the present work, deodorized fish oil and antioxidants were used, and thus, no statistical differences were observed between modified and conventional hamburger patties for odor, texture, taste, and overall acceptability (Table 4). In terms of juiciness, the developed patties achieved higher levels than one of the conventional products, probably due to the lower connective tissue content in the modified hamburger patty (Li et al. 2008).

Together with the problems associated with sensory properties, the potential increase of oxidation processes in the lipid fraction of meat products rich in  $n-3$  PUFAs is well documented in the literature (Valencia et al. 2006; Jiménez-Colmenero 2007). It is well known that lipid quality in foods is significantly influenced by its oxidative status (Koh et al. 2008). Thus, the undoubtedly positive health benefits associated with the lipid composition achieved in the modified products might involve a higher risk for the oxidative stability of the developed product. However, it has been previously demonstrated that the use of antioxidants such as  $\alpha$ -tocopherol can efficiently maintain lipid stability in meat products without oxidative alteration of the fatty acid profile (Wilkinson et al. 2001; Hoz et al. 2004; Scollan et al. 2006). It has also been

**Table 5** Evolution of TBARS and surface lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ), and yellowness ( $b^*$ ) in modified and conventional hamburger patties packaged under 20%/80% CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> modified atmosphere, stored for 8 days, and cooked

Parameters	Hamburger patty	Day 0 (n=12)	Day 1 (n=12)	Day 3 (n=12)	Day 5 (n=12)	Day 8 (n=12)	Cooked (n=12)
TBARS <sup>a</sup>	Modified	0.82±0.03b B	0.80±0.05b B	0.79±0.03b B	0.94±0.04b B	0.91±0.04b B	1.21±0.09a B
	Conventional	0.96±0.04d A	0.93±0.05d A	0.98±0.04d A	1.12±0.09c A	2.16±0.11b A	2.41±0.15a A
$L^*$	Modified	53.94±2.11a A	50.15±2.23b A	51.23±2.45b A	50.56±2.56b A	44.23±3.11c	40.84±2.94c
	Conventional	47.05±1.91a B	43.45±1.78b B	42.78±2.03b B	40.12±2.12b,c B	39.34±2.45c	37.84±3.21c
$a^*$	Modified	17.47±0.72a B	15.87±0.78b B	16.04±0.82b	15.88±1.1b	14.93±0.86b A	5.37±0.38c
	Conventional	22.12±1.57a A	18.85±1.12b A	17.24±1.23c	15.51±1.47c,d	13.67±0.84d B	5.41±0.42e
$b^*$	Modified	12.58±0.96a B	12.18±0.78a B	11.72±1.04a	10.93±0.76a,b	9.76±0.63b	11.14±0.59a,b
	Conventional	14.37±1.07a A	12.37±0.89b A	11.37±0.89b	10.21±0.95b,c	9.12±0.78c	10.92±0.83b,c

Results are expressed as means ± standard deviations. Averages with different lowercase letters in the same row are different ( $P<0.05$ ). Averages for each parameter with different uppercase letters in the same column are different ( $P<0.05$ )

<sup>a</sup> Expressed as milligrams of malonaldehyde per kilogram

reported that, due to its content of natural antioxidants, the use of corn oil as a supplement minimizes the lipid oxidation in beef patties (Dzudie et al. 2004), and that olive oil is a source of natural antioxidants such as  $\alpha$ -tocopherol (Bloukas et al. 1997; Jiménez-Colmenero 2007). Additionally, it was previously reported that when meat is packaged in a modified atmosphere with a high content of O<sub>2</sub> (70–80%), a storage temperature below 4 °C efficiently prevents lipid oxidation (Jakobsen and Bertelsen 2000). Thus, the TBARS values of fat from modified products (Table 5) were always lower than those obtained for conventional hamburger patties, and did not show significant variation during the 8 days of storage. However, as reported by Ferioli et al. (2008) for minced meat packaged under the same conditions, conventional patties showed a significant increase in TBARS values after 5 days of storage. Thus, the inclusion of  $\alpha$ -tocopherol, corn, and olive oil, as well as the packaging in a modified atmosphere (20%/80% CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>) and storage at 2 °C, was expected to reduce the lipid oxidation of the *n*-3 PUFAs carried by the deodorized fish oil in the modified hamburger patties during the storage of the product. Nevertheless, contrary to those reported by Ferioli et al. (2008) for minced beef, significant increases in TBARS values were observed after cooking procedure in both conventional and modified hamburger patties.

The changes in surface meat lightness ( $L^*$ ), redness ( $a^*$ ), and yellowness ( $b^*$ ) in modified and conventional burgers are given in Table 5. The substitution of the olive, corn, and deodorized fish oil contributed to a significantly lower  $a^*$  and  $b^*$  values in the developed product than in the conventional product, as was previously observed for other products such as pork sausages that were supplemented with fish oil (Estévez et al. 2005; Valencia et al. 2006). Additionally, lightness was higher in the modified product than in conventional products from day 0 to day 5, and no significant differences were obtained in day 8 and after cooking. As was previously described for minced beef supplemented with  $\alpha$ -tocopherol (Houben et al. 2002), decreases in  $L^*$  and  $a^*$  values were found in both modified and conventional hamburger patties after packaging. Additionally, a dramatic decrease was observed in  $a^*$  values after cooking in both conventional and modified hamburger patties. For the case of  $b^*$ , significant changes after packaging were found for conventional products, while no differences were found for modified products. During the storage of modified hamburger patties, no significant decrease was observed in  $a^*$  values which has been used as an indicator of color stability in meat and meat products (Houben et al. 2002). As was previously described by Jakobsen and Bertelsen (2000), packaging in a modified atmosphere with an oxygen content higher than 55% (80%) as well as a temperature storage of 2 °C efficiently maintained the red oxymyoglobin color.

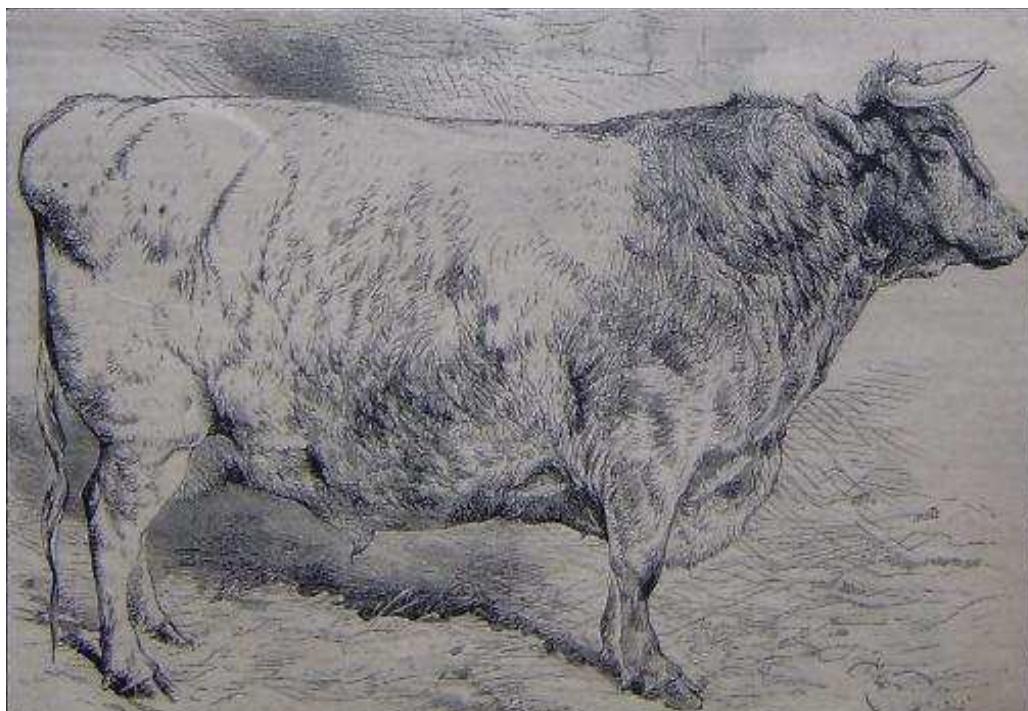
## Conclusions

The results obtained in the present research indicate that it is possible to develop a modified meat product enriched with *n*-3 PUFAs that also demonstrates better ratios of SFAs, MUFAs, and PUFAs and a lower content of fat, cholesterol, calories, and sodium content than conventional hamburger patties. The potential negative effects on lipid oxidation, redness discoloration, and consumer acceptability were prevented by the addition of antioxidants, packaging in a modified atmosphere, and storage at 2 °C. The market has demonstrated that consumers are inflexible and unwilling to change their dietary habits. Meats and meat products are an especially suitable vehicle for adding healthier components (such as *n*-3 PUFAs) to staple food items, thus improving nutritional regimes and precluding disease associated with unbalanced diets.

## References

- Allison, R.-G., & Senti, F.-R. (1983). *A perspective on the application of the Atwater system of food energy assessment*. Bethesda: Life Sciences Research Office, Federation of American Societies for Experimental Biology.
- American Dietetic Association. (2007). Position of the American Dietetic Association and Dieticians of Canada: dietary fatty acids. *Journal of the American Dietetic Association*, 107(3), 1599–1611.
- American Meat Science Association. (1995). *Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness measurements of fresh meat*. Chicago: AMSA.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). (2002). *Official methods of analysis* (17th ed.). Gaithersburg: AOAC.
- Bligh, E.-G., & Dyer, W.-J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 42, 371–386.
- Bloukas, J.-G., Paneras, E.-D., & Fournitzis, G.-C. (1997). Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 45(2), 133–144.
- Djordjevic, D., McClements, D.-J., & Decker, E.-A. (2004). Oxidative stability of whey protein-stabilized oil-in-water emulsions at pH 3: potential *n*-3 fatty acid delivery systems (part B). *Journal of Food Science*, 69(5), C356–C362.
- Dzudie, T., Kouebou, C.-P., Essia-Ngang, J.-J., & Mbofung, C.-M.-F. (2004). Lipid sources and essential oils effects on quality and stability of beef patties. *Journal of Food Engineering*, 65(1), 67–72.
- Esmael, D.-N., Nissar, A., Tahani, K.-A., & Montaha, B. (1994). Rapid and simple method for determination of cholesterol in processed food. *Journal of AOAC International*, 78(6), 1522–1525.
- Estévez, M., Ventanas, S., & Cava, R. (2005). Physicochemical properties and oxidative stability of liver pâté as affected by fat content. *Food Chemistry*, 92(3), 449–457.
- Ferioli, F., Caboni, M.-F., & Dutta, P.-C. (2008). Evaluation of cholesterol and lipid oxidation in raw and cooked minced beef stored under oxygen-enriched atmosphere. *Meat Science*, 80, 681–685.

- Garg, M.-L., Wood, L.-G., Singh, H., & Moughan, P.-J. (2006). Means of delivering recommended levels of long chain n-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *Journal of Food Science*, 71(5), R66–R71.
- Givens, D.-I., Cottrill, B.-R., Davies, M., Lee, P., Mansbridge, R., & Moss, A.-R. (2000). Sources of n-3 polyunsaturated fatty acids additional to fish oil for livestock diets. *Nutrition Abstracts and Reviews, Series B*, 70(1), 1–19.
- Givens, D.-I., Klien, K.-E., & Gibbs, R.-A. (2006). The role of meat as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids in the human diet. *Meat Science*, 74, 209–218.
- Houben, J.-H., van Dijk, A., & Eikelenboom, G. (2002). Dietary vitamin E supplementation, an ascorbic acid preparation, and packaging effects on colour stability and lipid oxidation in mince made from previously frozen lean beef. *European Food Research and Technology*, 214, 186–191.
- Hoz, L., D'Arrigo, M., Cambero, I., & Ordóñez, J.-A. (2004). Development of an n-3 fatty acid and  $\alpha$ -tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science*, 67(3), 485–495.
- Hur, S.-J., Park, G.-B., & Joo, S.-T. (2008). A comparison of the meat qualities from the Hanwoo (Korean native cattle) and Holstein steer. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 196–200.
- Jakobsen, M., & Bertelsen, G. (2000). Colour stability and lipid oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. *Meat Science*, 54, 49–57.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in eat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science & Technology*, 18(11), 567–578.
- Koh, S.-P., Arifin, N., Tan, C.-P., Yusoff, M.-S.-A., Long, K., & Lai, O.-M. (2008). Deep frying performance of enzymatically synthesized palm-based medium- and long-chain triacylglycerols (MLCT) oil blends. *Food and Bioprocess Technology*, doi:10.1007/s11947-008-0138-y, in press.
- Lee, S., Hernández, P., Djordjevic, D., Faraji, H., Hollender, R., Faustman, C., et al. (2006). Effect of antioxidants and cooking on stability of n-3 fatty acids in fortified meat products. *Journal of Food Science*, 71(3), C233–C238.
- Li, C.-B., Zhou, G.-H., & Xu, X.-L. (2008). Dynamical changes of beef intramuscular connective tissue and muscle fiber during heating and their effects on beef shear force. *Food and Bioprocess Technology*, doi:10.1007/s11947-008-0117-3, in press.
- Lo, S.-K., Tan, C.-P., Long, K., Affandi Yusoff, M.-S., & Lai, O.-M. (2008). Diacylglycerol oil-properties, processes and products: a review. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 223–233.
- Mata, P., & Ortega, R.-M. (2003). Omega-3 fatty acids in the prevention and control of cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(Suppl. 1), S22–S25.
- Morrison, W.-R., & Smith, L.-M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipid with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research*, 5, 600–608.
- Muguerza, E., Gimeno, O., Ansorena, D., Bloukas, J.-G., & Astiasarán, I. (2001). Effect of replacing pork backfat with pre-emulsified olive oil on lipid fraction and sensory quality of "Chorizo de Pamplona" a traditional Spanish fermented sausage. *Meat Science*, 59(3), 251–258.
- Norton, T., & Sun, D.-W. (2008). Recent advances in the use of high pressure as an effective processing technique in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 1, 2–34.
- Park, J., Rhee, K.-S., Keeton, J.-T., & Rhee, K.-C. (1989). Properties of low-fat frankfurters containing monounsaturated and omega-3 polyunsaturated oils. *Journal of Food Science*, 54(3), 500–504.
- Rosmini, M.-R., Perlo, F., Pérez-Álvarez, J.-A., Pagán-Moreno, M.-J., Gago-Gago, A., López-Santoñe, F., et al. (1995). TBA test by extractive method applied to "Paté". *Meat Science*, 42(1), 103–110.
- Scollan, N., Hocquette, J.-F., Nuernberg, K., Dannenberger, D., Richradson, I., & Moloney, A. (2006). Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with meat quality. *Meat Science*, 74, 17–33.
- Simopoulos, A.-P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(8), 365–379.
- Simopoulos, A.-P., Leaf, A., & Salem, N. (1999). Workshop on the essentiality and recommended dietary intakes for omega-6 and omega-3 fatty acids. *Journal of the American College of Nutrition*, 18(5), 487–489.
- Valencia, I., Ansorena, D., & Astiasarán, I. (2006). Nutritional and sensory properties of dry fermented sausages enriched with n-3 PUFAs. *Meat Science*, 72(4), 727–733.
- Wilkinson, A.-L., Sun, Q., Senecal, A., & Faustman, C. (2001). Antioxidant effects on TBARS and fluorescence measurements in freeze-dried meats. *Journal of Food Science*, 66, 20–24.
- Wood, J.-D., Enser, M., Fisher, A.-V., Nute, G.-R., Sheard, P.-R., Richardson, R.-I., et al. (2008). Fat deposition fatty acid composition and meat quality: a review. *Meat Science*, 78, 343–358.
- World Health Organization (WHO) (2003) Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases. WHO Technical Report Series 916. Geneva, Switzerland.



**4.2. Evaluación de transglutaminasa y caseinato para una formulación original de pasteles de carne de ternera enriquecidos en lípidos más sanos y fibra dietética.**

**Evaluation of transglutaminase and caseinate for a novel formulation of beef patties enriched in healthier lipid and dietary fiber**

Beatriz Martínez, José M. Miranda, Carlos M. Franco, Alberto Cepeda, Manuel Vázquez

LWT - Food Science and Technology, 44 (2011): 949-956



## Resumen

Dos de las características típicas de la dieta actual en los países desarrollados occidentales son el consumo deficiente de ácidos grasos *n*-3 y fibra. Por eso, en el presente estudio, se han desarrollado hamburguesas de ternera enriquecidas con ácidos grasos poliinsaturados *n*-3 y fibra.

El perfil de textura de estas hamburguesas enriquecidas con ácidos grasos *n*-3 y fibra fue evaluado, junto con otras características físico-químicas de las mismas. Los resultados obtenidos de esta evaluación se compararon con los obtenidos para las hamburguesas de ternera tradicionales, encontrándose diferencias significativas sólo en el caso de los parámetros de textura. Dentro de éstos, se observaron valores más bajos para todos los parámetros en el caso de las hamburguesas enriquecidas en ácidos grasos *n*-3 y fibra excepto para el caso de la elasticidad. El hecho de que su textura no sea típica podría provocar que la aceptabilidad de las hamburguesas enriquecidas en ácidos grasos *n*-3 y fibra por parte de los consumidores fuese más baja, a pesar de las ventajas nutricionales del producto.

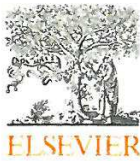
Para mejorar la textura del producto desarrollado, y conseguir una textura similar a la que presentan los productos tradicionales, se ha realizado un diseño experimental y de metodología estadística de las superficies de respuesta para el estudio de distintos pre-tratamientos, en los cuales se utiliza transglutaminasa (TG) y caseinato sódico (C).

Los modelos matemáticos obtenidos determinan el efecto de la TG, el C, la temperatura y el tiempo de pretratamiento en la textura de las hamburguesas. La optimización de los parámetros estadísticos indicó que un pretratamiento con 0,1 U/g de TG a 40 °C durante 17 min era el indicado para la obtención de hamburguesas de ternera enriquecidas en AGPI *n*-3 y fibra con una textura similar a las tradicionales. Además, los modelos mostraron que la adición de caseinato sódico no era necesaria para la obtención de los resultados deseados.

Un dato importante es el hecho de que tras la adición de transglutaminasa y el pretratamiento aplicado, se ha observado un efecto mínimo sobre la composición, el

color y las pérdidas por cocinado del producto desarrollado; no variando significativamente dichos parámetros con respecto a la misma formulación de producto que no ha sufrido pretratamiento ni adición de TG. Además, se observan mejores valores de agua extraíble, es decir, que el producto al que se le ha realizado el pretratamiento con TG tiene mayor capacidad de retención de agua.

Como conclusión, diremos que es posible obtener pasteles de carne de ternera, enriquecidos con AGPI *n*-3 y fibra dietética, con unos parámetros de textura similares a los de las hamburguesas convencionales, adecuados a las exigencias de los consumidores.



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/lwt](http://www.elsevier.com/locate/lwt)

## Evaluation of transglutaminase and caseinate for a novel formulation of beef patties enriched in healthier lipid and dietary fiber

Beatriz Martínez, José M. Miranda, Carlos M. Franco, Alberto Cepeda, Manuel Vázquez\*

LHICA, Department of Analytical Chemistry, Faculty of Veterinary Science, University of Santiago de Compostela, Campus Lugo, 27002 Lugo, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 April 2010  
Received in revised form  
16 November 2010  
Accepted 23 November 2010

#### Keywords:

Transglutaminase  
Sodium caseinate  
Beef patty  
Texture  
Fiber

### ABSTRACT

The food intake in developed countries is characterized by a deficient consumption of *n*-3 fatty acids and fiber. In this study, modified beef patties enriched with polyunsaturated *n*-3 fatty acids and fiber were developed. The texture profile was compared to traditional beef patties, showing lower values for all parameters except springiness. To improve its texture, pretreatments using transglutaminase (TG) and sodium caseinate (C) were assayed by response surface methodology. Mathematical models were obtained and used to determine the effect of TG, C, temperature and time of pretreatment on the texture of beef patties. The overall optimization indicated that a pretreatment with 0.1 U/g of TG at 40 °C for 17 min allowed to have a traditional texture for beef patties enriched in *n*-3 PUFAs and fiber. The models showed that the addition of caseinate was not needed. Minimal effects of pretreatment were observed on composition, color and cooking loss of the product.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### 1. Introduction

Human nutrition in developed countries is characterized by an excessive intake of energy, saturated fatty acids (SFA) and *n*-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA). Nutrition in these countries is also characterized by marked deficient intake of antioxidants, *n*-3 PUFA and dietary fiber (Mata & Ortega, 2003). These trends are important factors in the increase of chronic and degenerative illness. Scientific authorities and nutritional organizations have proposed recommendations to improve the human health: dietary fat intake should account for 15%–30% of the total diet energy; no more than 10% of the calorie intake should come from SFA; PUFA should represent 6–10% of the caloric intake (*n*-6, 5–8%; *n*-3, 1–2%); and approximately 10–15% of energy should come from monounsaturated fatty acids (MUFA) (WHO, 2003; Simopoulos, 2002). Additionally, an *n*-6/*n*-3 ratio of less than 4:1 is recommended (Wood et al., 2008), as well as a PUFA:SFA ratio of at least 0.4 (Luciano, 2009).

The traditional beef patties for hamburgers are high of fat content (about 14%). Most of this fat is SFA (about 60% of total fat), while the MUFA fraction accounts for about 36% of total fat, and the PUFA fraction accounts for about 3% of total fat (Martínez et al., in press). Additionally, *n*-3 fatty acids only account for about 0.5%, and their *n*-6/*n*-3 ratio (higher than 6:1) and their PUFA:SFA ratio

(about 0.06) is clearly over the recommendations of nutritional organizations (Simopoulos, 2002; WHO, 2003; Martínez et al., in press).

However, as one of the most common foods in the human diet, meats and meat products are especially suitable vehicles to carry healthier lipid additives. Food industry has introduced in recent years a wide variety of healthier lipid-enriched meat-based foods worldwide (Jiménez-Colmenero, 2007). Nevertheless, the addition of non-protein ingredients such as fiber and/or the substitution of saturate animal fat with vegetable oils have detrimental effects on texture properties of restructured meats (Sun, 2009). Thus, it has been reported that the required force to shear the beef patties decreases with increasing levels of soluble fiber (Desmond, Troy, & Buckley, 1998; Troy, Desmond, & Buckley, 1999) and that replacing backfat with olive oil in pork sausages affect their appearance and their firmness (Bloukas, Paneras, & Fournitzis, 1997).

On the other hand, previous studies on meat products fortified with oil emulsions used mostly cooked products to determine the texture properties, and only a few studies used raw products (Gujral, Kaur, Singh, & Sodhi, 2002). In these previous studies, the beef patties with added oil emulsions or fiber often have a different appearance than traditional products (Bloukas et al., 1997; Noriega-Rodríguez et al., 2009). External appearance of the raw meat is an important factor in the consumer's decision to purchase the product.

The texture properties and appearance of fresh meat products can be maintained by using binder agents, such as sodium caseinate, which is frequently used in meat and fish products

\* Corresponding author. Tel.: +34 982822420; fax: +34 982254592.  
E-mail address: [manuel.vazquez@usc.es](mailto:manuel.vazquez@usc.es) (M. Vázquez).

(Ramírez, Del-Ángel, Velazquez, & Vázquez, 2006; Tsai, Unklesbay, Unklesbay, & Clarke, 2002). Another binder agent is microbial transglutaminase (TG), which induces the cross-linking of adjacent proteins forming isopeptidic covalent bonds (Kumazawa, Seguro, Takamura, & Motoki, 1993; Seki, Nozawa, & Shaowei, 1998). TG has been used in conjunction with sodium caseinate (C) as a cold binder to produce restructured meat (Kuraishi et al., 1997). During the last decade, TG has been used in the production of restructured meat products (Sun, 2009). However, to our knowledge, TG has not been used in hamburger beef patties.

The aim of this work was to develop novel beef patties with lower levels of total fat and SFA, better ratio of n-6/n-3 PUFA, higher levels of dietary fiber and textural properties similar than traditional raw beef patties. Pretreatments with TG and C at several temperatures (T) and time (t) were studied. The effects of these variables on the texture profile of raw patties were determined and optimized to obtain beef patties with better nutritional properties and without texture disadvantages when compared to traditional counterparts.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Raw materials

Fresh boneless beef cuts from the brisket and flank were obtained from a local market (Lugo, Spain). Visible fat and connective tissue were removed manually. The meat was stored at 4 °C for 12–24 h until the product manufacturing.

TG was obtained from Ajinomoto Co. (ACTIVA WM, Ajinomoto Europe Sales GmbH, Germany). The composition of the product was 99% maltodextrin and 1% transglutaminase. The enzyme activity was reported as 100 units (U)/g by the manufacturer. However, it was measured and the real value was slightly lower in the enzyme lot used (96 U/g). The enzyme activity was determined by the colorimetric procedure (Grossowicz, Wainfan, Borek, & Waelsch, 1950).

Emulsion of oils containing solid soy protein, olive oil, corn oil, deodorized cod liver oil (Denomega 100.1, Borregaard, Sarpsborg, Norway) and  $\alpha$ -tocopherol (B TSA, Madrid, Spain) was prepared, as reported by Bloukas et al. (1997). C was provided by Anvisa (Madrid, Spain).

### 2.2. Preparation of beef patties

The overall process is shown in Fig. 1. Fresh meat was chopped in an industrial blender (Mainca, Barcelona, Spain) to 12 mm. The ingredients are listed in Table 1. Soluble fiber (inulin) (Frutafit® HD, Sensus, Roosendaal, Holland) was added as a gel in distillate water 50% (w/w) and insoluble fiber was provided by Jelucell (Jelucell WF-200®, HELA Gewürzwerk Hermann Laue GmbH & Co, Hauptsitz, Germany).

Once all ingredients were weighed, a primary mixture containing raw meat, pre-emulsified oils and soluble fiber were mixed

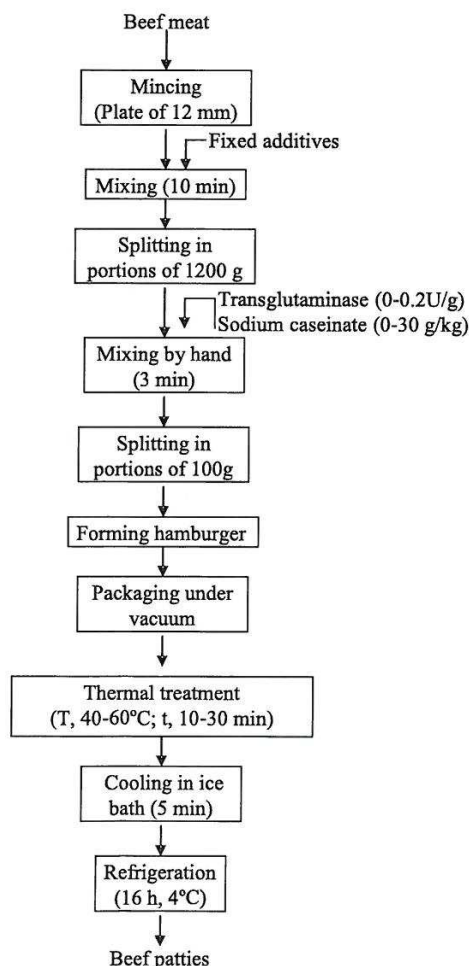


Fig. 1. Overall process for the manufacture of the beef patties proposed in this study.

**Table 1**  
Variables involved in the experiments design for the novel beef patties and their nomenclature, units and values or ranges.

	Nomenclature	Values or ranges	Units
<b>(a) Fixed variables</b>			
Time of mixture		10	min
Time of storage between treatment and analysis		16	h
Temperature of storage between treatment and analysis		4	°C
<b>(b) Fixed formulation (per kg of product)</b>			
Beef meat		850.38	g
Emulsion of oils (oil:protein:water 10:1:8)		63.32	g
Soluble fiber in distillate water 50% (w/w)		60	g
Insoluble fiber		10	g
Freeze-drier garlic		2.70	g
Yeast extract		2.00	g
Onion aroma		1	g
Black pepper		0.8	g
Ascorbyl palmitate		0.75	g
Sodium metabisulphite		0.4	g
<b>(c) Independent variables</b>			
Ratio enzyme/substrate	TG	(0–0.2)	U/g
Sodium caseinate concentration	C	(0–30)	g/kg
Temperature of pretreatment	T	(40–60)	°C
Time of pretreatment	t	(10–30)	min
<b>(d) Dependent variable</b>			
Hardness	Hd		N
Adhesiveness	Adh		N*s
Springiness	Spr		
Cohesiveness	Ch		
Chewiness	Chw		N

in an industrial kneading machine (Mainca, Barcelona, Spain) for 2 min. All the other powdered ingredients were mixed previously to obtain a homogenous powder, and they were added subsequently in the kneading machine and mixed with the primary mixture for 8 min. Then the mixture was divided into portions of approximately 1200 g for each design experiment (see below). TG and C were added at different levels following the experimental design (Table 2) and were manually kneaded with the mixture for 3 min. Portions of 100 g were machine-shaped into a hamburger patty. Beef patties were vacuum packed using a Vac-210 packing machine (Guasch, Barcelona, Spain) in high barrier bags made of polyamide/polyethylene. Afterwards, the patties were subjected to thermal treatments at the T and t for the experimental design (Table 2). After the treatment, rapid cooling in an ice bath was performed, and the patties were subsequently stored at 4 °C for 16 h until analysis.

Three lots of initial and optimized formulations of approximately 1200 g of mixture each lot (12 units per lot) were manufactured using the same technology. The initial formulation was used as a control, and the modified products were manufactured according with the parameters fixed for the experimental design.

### 2.3. Mechanical properties of beef patties

Texture profile analysis (TPA) was carried out using a texturimeter TA-XTplus (Stable Micro System, Viena Court, UK). The samples of raw beef patties were cut into small cubes

(2 × 2 × 1.5 cm) and analyzed at room temperature. TPA was carried out using a cylindrical aluminum probe (P/50). Samples were compressed to 75% of the original height using a compression speed of 60 mm/min. Hardness, adhesiveness, springiness, cohesiveness and chewiness were determined (Castro-Briones et al., 2009; Hoz, D'Arrigo, Cambero, & Ordóñez, 2003; Anton & Luciano, 2007; Sun, 2009).

For the experimental design (see below), six samples were analyzed for each treatment in duplicate (n = 12). In the case of the initial and optimized formulations three samples per lot was analyze in duplicate (n = 18). To compare the values of texture with traditional products three beef burgers of four different brands were analyze in duplicate (n = 24).

### 2.4. Experimental design

Response surface methodology was used to study the effect and interactions of four independent experimental variables (TG, C, T, t) on textural properties of modified beef patties. Experimental design and statistical analysis were performed using the software Design-Expert 7.1.1 (Stat-Ease Inc., MN, USA).

The set of experiments followed the Box & Behnken design (1960). The factors and ranges studied were: TG, 0–0.2 U/g; C, 0–30 g/kg; T, 40–60 °C; and t, 10–30 min. Thirty-six experiments combining the four variables were performed following the design of Table 2.

**Table 2**  
Operational conditions assayed in accord with the experimental design.  $x_{(1-4)}$  are dimensionless variables of the experimental design.

Experiment	Independent variables				Dimensionless			
	Dimensional				Dimensionless			
	Transglutaminase (U/g)	Sodium Caseinate g/kg	Temperature (°C)	Time (min)	$x_1$	$x_2$	$x_3$	$x_4$
1	0.1	15	40	10	0	0	-1	-1
2	0.2	30	50	20	1	1	0	0
3	0.1	15	50	20	0	0	0	0
4	0	0	50	20	-1	-1	0	0
5	0	30	50	20	-1	1	0	0
6	0.1	15	50	20	0	0	0	0
7	0.1	15	60	10	0	0	1	-1
8	0.1	15	50	20	0	0	0	0
9	0.2	0	50	20	1	-1	0	0
10	0.1	15	50	20	0	0	0	0
11	0.1	15	40	30	0	0	-1	1
12	0.1	15	60	30	0	0	1	1
13	0.1	15	50	20	0	0	0	0
14	0.1	15	50	20	0	0	0	0
15	0.1	15	50	20	0	0	0	0
16	0.1	0	60	20	0	-1	1	0
17	0.1	30	60	20	0	1	1	0
18	0.2	15	50	30	1	0	0	1
19	0	15	50	10	-1	0	0	-1
20	0.1	30	40	20	0	1	-1	0
21	0.1	15	50	20	0	0	0	0
22	0	15	50	30	-1	0	0	1
23	0.1	0	40	20	0	-1	-1	0
24	0.2	15	50	10	1	0	0	-1
25	0.1	15	50	20	0	0	0	0
26	0.1	0	50	30	0	-1	0	1
27	0.1	15	50	20	0	0	0	0
28	0	15	60	20	-1	0	1	0
29	0.2	15	60	20	1	0	1	0
30	0.1	15	50	20	0	0	0	0
31	0	15	40	20	-1	0	-1	0
32	0.1	30	50	10	0	1	0	-1
33	0.2	15	40	20	1	0	-1	0
34	0.1	0	50	10	0	-1	0	-1
35	0.1	15	50	20	0	0	0	0
36	0.1	30	50	10	0	1	0	-1

For computation purposes, the normalized, dimensionless variables  $x_1$ ,  $x_2$ ,  $x_3$  and  $x_4$  were defined as:

$$x_1 = \frac{TG - 0.1}{0.1}$$

$$x_2 = \frac{C - 15}{15}$$

$$x_3 = \frac{T - 50}{10}$$

$$x_4 = \frac{t - 20}{10}$$

Error assessment was based on replication of the central point (twelve times). The mathematical model used as the first approach was a polynomial model of quadratic order as shown in the following equation:

$$y_i = b_{0i} + b_{1i}x_1 + b_{2i}x_2 + b_{3i}x_3 + b_{4i}x_4 + b_{5i}x_1x_2 + b_{6i}x_1x_3 + b_{7i}x_1x_4 + b_{8i}x_2x_3 + b_{9i}x_2x_4 + b_{10i}x_3x_4 + b_{11i}x_1^2 + b_{12i}x_2^2 + b_{13i}x_3^2 + b_{14i}x_4^2$$

In the above equation,  $y_i$  ( $i = 1-5$ ) are the dependent variables (hardness, adhesiveness, springiness, cohesiveness, or chewiness) and  $b_{0i} \dots b_{14i}$  are regression coefficients calculated from the experimental data by multiple linear regressions. The results were analyzed using analysis of variance (ANOVA). Model terms were selected based on the  $P$ -value with 95% confidence level. Partial models of the quadratic model were also obtained and analyzed by ANOVA.

2.5. Compositional analysis

Three samples of each lot from both initial (control) and optimized formulations were analyzed in duplicate ( $n = 18$ ). The quantities of protein (AOAC 981.10), moisture (AOAC 950.46), ash (AOAC 920.153), total fat (AOAC 991.36) and dietary fiber (AOAC 992.16) were analyzed following AOAC (2002) procedures. Carbohydrates and energy content were determined according to the procedure recommended by Allison and Senti (1983).

The fatty acid content was determined based on a lipid extract obtained by the Bligh and Dyer (1959) method. The fatty acid composition was determined using gas chromatography. Boron trifluoride/methanol was used to separate fatty acid methyl esters (Morrison & Smith, 1964), which were finally dissolved in hexane. The conditions for Gas Chromatography were the same as reported by Martínez et al., in press.

2.6. Determination of color, expressible water and cooking loss

Spectral reflectance of three samples of each lot in duplicate ( $n = 18$ ) from beef patties was determined using a portable

colorimeter (X-Rite spectrophotometer model 968, X-Rite Incorporated, Grandville, MI, USA) calibrated against black and white tiles. CIE  $L^*$ ,  $a^*$  and  $b^*$  values were determined. The illuminant used was D65 and the standard observer position was  $10^\circ$ .

The expressible water ( $E_w$ ) was measured in samples of 3 g ( $\pm 0.2$  g) that were weighed and placed into two layers of filter paper. Samples were placed at the bottom of 50 mL centrifuge tubes and centrifuged (10,000 g for 15 min at  $15^\circ\text{C}$ ). Immediately after centrifugation, the samples were weighed and the  $E_w$  was calculated.

Cooking loss was determined by weighing three patties from each lot ( $n = 9$ ) before cooking and after cooking. Cooking loss was expressed as a percentage of the initial weight. The cooking of all samples was done according to those recommended by the American Meat Science Association (AMSA, 1995).

3. Results and discussion

As a first approach, beef patties formulated with healthier lipid profile and enriched with dietary fiber (initial formulation) were obtained. Texture parameters were measured and compared to those obtained for traditional patties (Table 3). The TPA values obtained for patties with the initial formulation were significantly lower than those obtained for traditional products for all parameters except springiness. Thus, although the composition of the initial formulation is more in accord with the nutritionists' recommendations than traditional patties (Simopoulos, 2002, WHO, 2003), their texture is not typical. Consequently, the consumers' acceptability could be lower.

The lower values of most texture parameters of initial formulation due to the addition of fiber and oil emulsion confirms the results obtained from cooked beef patties by Suman and Sharma (2003) and Kumar and Sharma (2004). These studies observed that the shear force decreased significantly in low-fat beef patties when compared with control ones. Additionally, the results obtained are compatible with those reported by Desmond et al. (1998) and Troy et al. (1999) because the force required to shear or to compress beef patties decreased with increasing levels of soluble fiber.

To obtain similar texture parameters as traditional patties, a statistical design approach using response surface methodology was used. Table 4 lists the results obtained for each experiment under the conditions assayed. After the treatment, hardness varied within the wide range of 38–182 N (Table 4). The traditional patties showed a mean hardness of 65 N (Table 3). Adhesiveness was in the range (–3.90)–(–0.14 N s). The traditional patties showed a mean value of –2.29 N s. Springiness was in the range 0.313–0.612 while the traditional patties showed a value of 0.280. Cohesiveness was in the range (0.225–0.460), the traditional patties had a value of 0.270. Finally, the range for Chewiness was 2.74–39.47 N and the value for the traditional patties was 5.02 N.

All the values of traditional patties (targets) were within the ranges obtained for each variable of the texture properties using

Table 3 Values of the texture properties of the traditional beef patties, initial formulation, predicted optimized formulation and experimental optimized formulation.

	Hardness (N)	Adhesiveness (N.sec)	Springiness	Cohesiveness	Chewiness (N)
Traditional beef patties	65.75 ± 6.52 <sup>a</sup>	–2.29 ± 0.84 <sup>b</sup>	0.284 ± 0.030	0.267 ± 0.039 <sup>b</sup>	5.02 ± 1.29 <sup>a</sup>
Initial formulation	29.90 ± 2.98 <sup>b</sup>	–3.29 ± 0.57 <sup>c</sup>	0.262 ± 0.060	0.196 ± 0.012 <sup>c</sup>	1.54 ± 0.43 <sup>b</sup>
Predicted values by the models for the optimal formulation	60.05	NSM	0.356	0.294	5.04
Experimental optimal formulation	66.91 ± 14.00 <sup>a</sup>	–0.72 ± 0.19 <sup>a</sup>	0.284 ± 0.016	0.295 ± 0.013 <sup>a</sup>	5.68 ± 1.65 <sup>a</sup>

Results are expressed as means ± standard deviations.  
<sup>a-b</sup>Means of the same column with different letters are significantly different ( $P < 0.05$ ).  
 Optimum conditions (TG, 0.1 U/g; C, 0 g/kg; T, 40 °C; t, 17.18 min).  
 NSM = no significant model.

**Table 4**

Experimental results achieved for the pretreatments of the experimental design. Hd is hardness, Adh is adhesiveness, Spr is springiness, Ch is Cohesiveness, and Chw is chewiness.

Experiment	Hd (N)	Adh (N*s)	Spr	Ch	Chw (N)
1	43.94	-1.03	0.362	0.307	4.94
2	74.11	-0.49	0.498	0.347	12.94
3	58.19	-1.87	0.382	0.285	6.43
4	58.53	-0.73	0.359	0.344	7.31
5	56.48	-2.18	0.390	0.315	6.96
6	57.75	-1.59	0.377	0.315	6.90
7	111.42	-0.15	0.472	0.368	19.24
8	38.44	-0.56	0.294	0.241	2.74
9	98.16	-0.38	0.392	0.361	14.02
10	61.17	-0.37	0.334	0.316	6.54
11	73.38	-0.64	0.383	0.293	8.22
12	138.72	-0.14	0.604	0.460	38.70
13	66.81	-0.30	0.414	0.333	9.29
14	74.55	-0.37	0.379	0.276	7.78
15	66.52	-0.91	0.375	0.270	6.73
16	150.74	-0.17	0.585	0.448	39.48
17	91.20	-0.31	0.503	0.366	16.74
18	96.75	-0.22	0.484	0.351	16.55
19	41.08	-3.72	0.303	0.225	2.79
20	67.69	-3.90	0.313	0.236	5.03
21	55.70	-1.24	0.353	0.316	6.26
22	62.55	-1.61	0.340	0.255	5.41
23	63.78	-2.99	0.316	0.239	4.83
24	69.56	-2.18	0.358	0.256	6.39
25	78.00	-0.44	0.447	0.309	10.70
26	127.94	-0.69	0.422	0.344	18.71
27	89.37	-0.39	0.449	0.349	13.94
28	147.03	-0.35	0.450	0.421	27.63
29	182.56	-0.24	0.612	0.457	51.04
30	106.89	-0.42	0.398	0.349	15.15
31	46.07	-3.90	0.355	0.224	3.65
32	64.41	-1.82	0.366	0.250	6.24
33	102.06	-0.55	0.428	0.349	14.77
34	91.50	-0.49	0.338	0.348	11.68
35	76.85	-0.48	0.338	0.300	7.98
36	62.87	-0.78	0.330	0.282	5.99

the new formulation with TG and sodium caseinate. However, the conditions needed to obtain the optimal value for one of them were not the best conditions for the others.

Therefore, mathematical models were obtained for each variable of the TPA in order to better understand the process and to can find the conditions of convenience to be so close as possible to the traditional patties for all the variables implied in the TPA. The equations obtained are shown in Table 5. The analysis of variance (ANOVA) for the regression equation of each dependent variable allowed the models to be reduced deleting non-significant terms. At the same time, the reduction improves the robustness of the models. Therefore, the models showed in Table 5 do not include insignificant terms.

For the case of adhesiveness, the model was significant with an F-value of 8.25, though the lack of fit of the F-value was high (2.83). This implies that the lack of fit is significant, showing that this variable is very affected by the noise of the measure. Therefore, it is

not recommended that this model be used for optimization purposes; the model was not included in Table 5. For the chewiness (Chw) response, data transformations were needed. A square root function was applied for this response.

Table 5 also includes the statistical indexes for all the models. The value of coefficient of determination  $r^2$  was in the range 0.923–0.819. This is a measure of the amount of variation around the mean as explained by the model and does not give useful information about whether this model can be used for all the population and not only for the samples. For this purpose, it is better to compare the values of adjusted  $r^2$  and predicted  $r^2$ .

Parameter adjusted  $r^2$  is a measure of the amount of variation around the mean as explained by the model, adjusted for the number of terms in the model. The adjusted  $r^2$  decreases as the number of terms in the model increases, if those additional terms do not add value to the model. The predicted  $r^2$  is defined as a measure of the amount of variation in new data that could be explained by the model. The predicted  $r^2$  and the adjusted  $r^2$  should be within 0.20 of each other to be in a reasonable agreement. The adequate precision (adeq. precision) of the model is a measure of the range in predicted response relative to associated error, or, in other words, a signal-to-noise ratio. Its desired value is 4 or more (Mason, Gunst, & Hess, 2003).

All the models obtained showed a predicted  $r^2$  in reasonable agreement with adjusted  $r^2$  and an adequate precision in the range 14.77–25.10. Therefore, these statistical indexes found desirable all models.

### 3.1. Modeling

For the quadratic model of hardness, in accordance with the criterion for the ANOVA test, the terms for the interactions TG-C, TG-T, TG-t, C-t and T-t were not significant model terms since their p-values were higher than 0.05. The reduction deleting these terms improved the model. The F-value of 37.08 obtained and the value of p-value probability > F less than 0.0001 imply that the reduced model shown in Table 5 was significant.

The response surface of the model for hardness with real variables is shown in Fig. 2. TG and C were fixed at the central levels (TG, 0.1 U/g and C, 15 g/kg) because they were the variables that showed a lower influence. The more influential terms were the linear and quadratic terms for temperature and the linear term for time. The curvature of the plot shows the quadratic effect of the temperature. The lowest level of hardness (31.30 N) was predicted by the model at 44 °C for 10 min (no TG and 19.9 g/kg C added) and the highest (204.14 N) at 60 °C for 30 min using 0.2 U/g of TG and no C added.

The model for springiness (Table 5) showed that the more influential variable was the temperature, followed by TG and time. The term for C was not significant. Fig. 3 shows the plot for springiness. Increasing TG at a fixed value of temperature, the value of springiness will increase linearly. The model predicts the lowest springiness at 43 °C without TG. The highest (0.700) is predicted in the treatment at 60 °C for 30 min and 0.2 U/g of TG.

**Table 5**

Models obtained and statistical indexes.

Reduced models	$r^2$	Adjusted $r^2$	Predicted $r^2$	Adequate precision
Hardness (N) = 490.85 + 73.91 TG + 37.72 C - 22.94T + 1.47 t - 1.06 C*T + 511.36 TG <sup>2</sup> + 2.38C <sup>2</sup> + 0.28 T <sup>2</sup>	0.9223	0.8974	0.8086	24.109
Springiness = 1.87 - 1.09 TG - 0.06 T - 0.01 t + 0.02 TG*T + 0.02 TG*t + 2.78E <sup>-4</sup> T*t + 6.52E <sup>-4</sup> T <sup>2</sup>	0.8210	0.7729	0.7142	15.113
Cohesiveness = 1.049 + 0.902 * TG - 0.013 * C - 0.034 T - 0.013 t - 0.019 TG*T + 0.016 TG*t + 2.64E <sup>-4</sup> T*t + 3.84E <sup>-4</sup> T <sup>2</sup> .	0.8190	0.7611	0.6584	14.773
Sqrt (Chewiness) = 21.38 + 7.02*TG + 1.64*C - 0.94*T - 0.09*t - 0.04*C*T + 0.003*T*t + 0.011*T <sup>2</sup>	0.9230	0.9023	0.8661	25.101

R<sup>2</sup>: determination coefficient, Sqr = Squared Root.

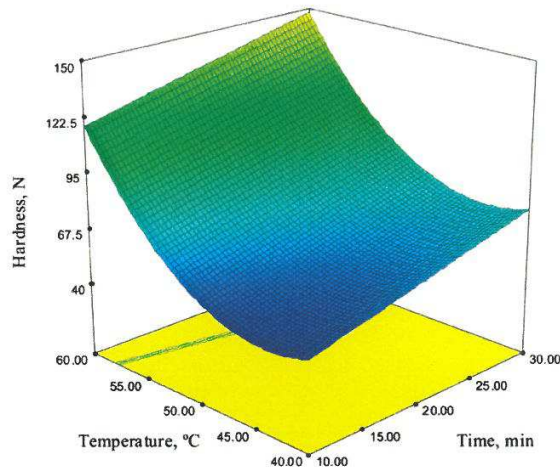


Fig. 2. Prediction of the model for the dependence of hardness on time and temperature when transglutaminase and caseinate are fixed at the central level (TG, 0.1 U/g and C, 1.5%).

The model for cohesiveness (Table 5) includes the significant term after the ANOVA. All the linear terms were significant, with temperature being the most influential. The interaction TG-T, TG-t and T-t, and the quadratic term for T, were also significant. In Fig. 4, the values of C and time were fixed at the central levels (C, 15 g/kg; t, 20 min). The effect of TG was mainly observed at lower temperature; meanwhile this is negligible at high temperature due to the important effect of the quadratic term of the temperature. Increasing temperature, cohesiveness can reach values of 0.513 at 60 °C for 30 min using 0.2 U/g of TG (no C added).

Finally, the initial model for chewiness was not significant. The ratio max/min value for this variable was 18.60. A value higher than 10 usually indicates that a data transformation is required. A Box-Cox analysis for power transformation was performed, and it showed that a square root transformation can improve the model. Therefore, a model for the square root of chewiness was fitted. It was significant and the reduced terms are shown in Table 5.

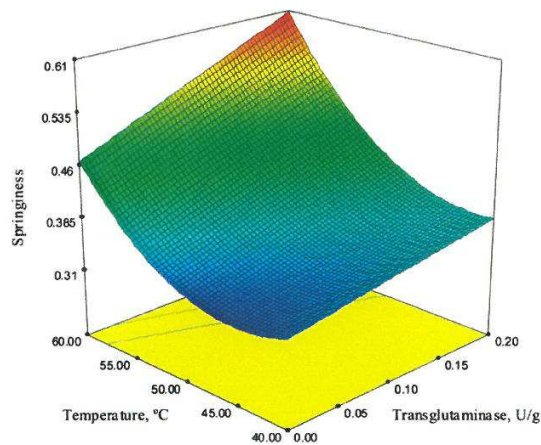


Fig. 3. Prediction of the model for the dependence of springiness on transglutaminase and temperature when time is fixed at the central level (t, 20 min).

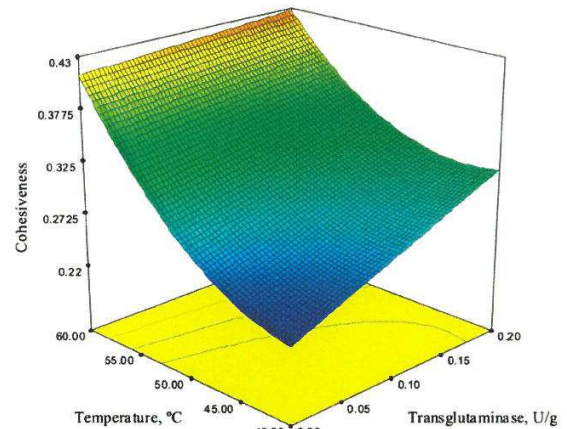


Fig. 4. Prediction of the model for the dependence of cohesiveness on temperature and transglutaminase when caseinate and time are fixed at the central level (C, 1.5% and t, 20 min).

Temperature was the term most influential in the model, followed by TG. Fig. 5 shows the response surface. The model predicts that the lowest chewiness can be obtained in a treatment at 42 °C for 10 min without additives. The highest value was predicted at 60 °C for 30 min using 0.2 U/g of TG (no C added).

### 3.2. Process optimization

Applying the models, it is possible to obtain the most similar texture to the traditional beef patties when considering the many responses involved in the mechanical properties related with the texture.

The constraints considered for the optimization of texture values for the beef patties developed were as follows: The level of TG should be fixed in the range (0–0.2 U/g). Caseinate should be used as low as possible because this was cited as allergen in cow's milk allergic people (Besler, Steinhart, & Paschke, 2001; Weber, Steinhart, & Paschke, 2009). Temperature of pretreatment should be minimized to maintain the appearance of the patties, especially

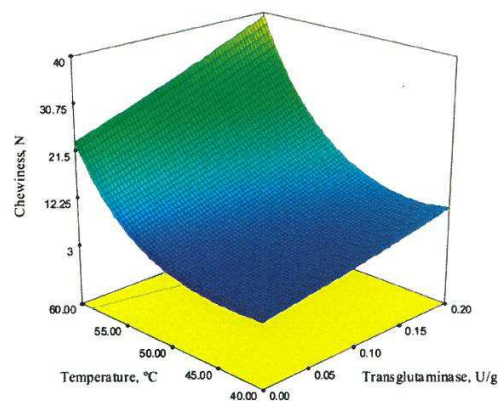


Fig. 5. Prediction of the model for the dependence of chewiness on temperature and transglutaminase, when caseinate and time are fixed at the central level (C, 1.5% and t, 20 min).

**Table 6**

Proximate composition including fatty acid profile, color, expressible water and cooking loss of beef patties manufactured with the initial formulation (control) and optimized formulation. Results are expressed as means  $\pm$  standard deviations. Only expressible water showed significant differences ( $P < 0.05$ ) between formulations.

	Initial formulation	Optimized formulation
Dry matter (g/kg)	330.6 $\pm$ 2.0	339.0 $\pm$ 2.3
Fat (g/kg)	80.9 $\pm$ 1.6	77.7 $\pm$ 3.9
SFA (% of total fatty acids)	29.87 $\pm$ 0.66	29.37 $\pm$ 0.42
MUFA (% of total fatty acids)	45.51 $\pm$ 0.51	44.89 $\pm$ 0.74
PUFA (% of total fatty acids)	21.67 $\pm$ 0.06	22.78 $\pm$ 1.23
n-6 fatty acids (% of total fatty acids)	18.36 $\pm$ 0.05	19.04 $\pm$ 1.05
n-3 fatty acids (% of total fatty acids)	4.85 $\pm$ 0.11	5.22 $\pm$ 1.16
n-6/n-3 ratio	3.78 $\pm$ 0.10	3.64 $\pm$ 0.09
PUFA/SFA ratio	0.73 $\pm$ 0.02	0.78 $\pm$ 0.05
Protein (g/kg)	187.5 $\pm$ 0.8	189.9 $\pm$ 0.2
Carbohydrates (g/kg)	39.2 $\pm$ 6.2	53.0 $\pm$ 3.6
Fiber (g/kg)	53.5 $\pm$ 5.7	39.9 $\pm$ 7.7
Ash (g/kg)	23.1 $\pm$ 1.9	20.8 $\pm$ 1.3
Energy (kJ/kg)	6.16 $\pm$ 39.30	6.44 $\pm$ 2.40
L*	50.05 $\pm$ 1.54	50.60 $\pm$ 2.90
a*	11.25 $\pm$ 0.98	9.65 $\pm$ 1.33
b*	17.52 $\pm$ 1.54	16.02 $\pm$ 0.07
Expressible water (%)	29.273 $\pm$ 2.455	22.733 $\pm$ 1.253
Cooking loss (%)	29.977 $\pm$ 0.811	29.265 $\pm$ 1.350

their color. Temperature must be higher than 40 °C in order to minimize the microbial growth. The time of pretreatment should be short (between 10 and 30 min) for hygienic reasons.

The constraints for the texture parameters were chosen to obtain similar values of the traditional beef patties. For hardness, it was restricted between 60 and 80 N. Springiness and chewiness were minimized because high values are undesirable. Cohesiveness was restricted within the range (0.23–0.3).

The conditions selected by the statistical software that allowed for the fulfillment of all these constraints were TG, 0.1 U/g; C, 0 g/kg; T, 40 °C and t, 17 min. Using these optimized conditions, the TPA values predicted for the model are shown in Table 3. These values are very close to the values of the traditional patties.

To validate the accuracy of the models, a confirmatory manufacture of beef patties was carried out using the optimal conditions chosen. Table 3 shows the results of the confirmatory experiment. The experimental results were in close agreement with the model prediction in all the cases. No significant differences were found in TPA parameters between the optimized formulation and the traditional beef patties, except for the case of adhesiveness and cohesiveness, which were higher in the experimental optimized formulation than in traditional beef patties (Table 3).

For comparative purposes, the values of composition, color, and cooking loss for the initial formulation and the experimental optimized formulation were determined (Table 6). No statistical differences were observed between both products. This indicates that the pretreatment with TG did not affect the studied parameters. In the case of expressible water and cooking loss, these results agree with Sun (2009) that has reported that the cooking loss increase by addition of TG in high-salt (2%) products but not in low-salt (1%) products (Sun, 2009) and Castro-Briones et al. (2009) have observed that no significant changes by effect of adding TG or by thermal treatment in the cooking loss of beef gels. Nevertheless, with regards to color, other authors have observed that the addition of TG causes color deterioration (Sun, 2009) but this fact has not been observed in our product.

#### 4. Conclusions

Healthier beef patties enriched with n-3 PUFAs and fiber showed significant lower values of texture parameter compared

with the values for traditional patties. To improve the texture, the modeling and optimization of a TG pretreatment indicate that it is feasible to obtain a novel beef patties enriched with n-3 PUFAs and fiber with the texture parameters that the consumers are used to purchase and to eat. The novel process includes a step of pretreatment with TG at 40 °C for 17 min. The models showed that the addition of sodium caseinate is not needed. The optimized pretreatment showed a minimal effect on color and cooking loss, improved the values of expressible water and allowed to obtain similar texture than traditional patties.

#### Acknowledgements

This work was financially supported in part by ASOGACARNE, Xunta de Galicia (project PGDIT05TAL019E) and Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain) (project AGL2006-08250/ALI).

#### References

- Allison, R. G., & Senti, F. R. (1983). *A perspective on the application of the Atwater system of food energy assessment*. Bethesda, MD: Life Sciences Research Office, Federation of American Societies for Experimental Biology.
- American Meat Science Association. (1995). *Research guidelines for cookery, sensory evaluation and instrumental tenderness measurements of fresh meat*. Chicago, IL: American Meat Science Association and National Live Stock and Meat Board. 1–48.
- Anton, A. A., & Luciano, F. B. (2007). Instrumental texture evaluation of extruded snack foods: a review. *Ciencia y Tecnología Alimentaria*, 5(4), 245–251.
- AOAC. (2002). *Official Methods of analysis* (17th ed.). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists, Inc.
- Besler, M., Steinhart, H., & Paschke, A. (2001). Stability of food allergens and allergenicity of processed foods. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 756(1–2), 207–228.
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 42, 371–386.
- Bloukas, J. G., Paneras, E. D., & Fournitzis, G. C. (1997). Effect of replacing pork backfat with olive oil on processing and quality characteristics of fermented sausages. *Meat Science*, 45(2), 133–144.
- Box, G., & Behnken, D. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. *Technometrics*, 2, 455–475.
- Castro-Briones, M., Calderón, G. N., Velazquez, G., Salud-Rubio, M., Vázquez, M., & Ramírez, J. A. (2009). Effect of setting conditions using microbial transglutaminase during obtention of beef gels. *Journal of Food Process Engineering*, 32, 221–234.
- Desmond, E., Troy, D., & Buckley, D. (1998). Comparative studies of nonmeat adjuncts used in the manufacture of low-fat beef burgers. *Journal of Muscle Foods*, 9(3), 221–241.
- Grossowicz, N., Wainfan, E., Borek, E., & Walsch, H. (1950). The enzymatic formation of hydroxamic acids from glutamine and asparagine. *Journal of Biological Chemistry*, 187, 111–125.
- Gujral, H. S., Kaur, A., Singh, N., & Sodhi, N. S. (2002). Effect of liquid whole egg, fat and textured soy protein on the textural and cooking properties of raw and baked patties from goat meat. *Journal of Food Engineering*, 53(4), 377–385.
- Hoz, L., D'Arrigo, M., Cambero, I., & Ordóñez, J. A. (2003). Development of an n-3 fatty acid and  $\alpha$ -tocopherol enriched dry fermented sausage. *Meat Science*, 67, 485–495.
- Jiménez-Colmenero, F. (2007). Healthier lipid formulation approaches in eat-based functional foods. Technological options for replacement of meat fats by non-meat fats. *Trends in Food Science & Technology*, 18(11), 567–578.
- Kumar, M., & Sharma, B. (2004). The storage stability and textural, physico-chemical and sensory quality of low-fat ground pork patties with carrageenan as fat replacer. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 31–42.
- Kumazawa, Y., Seguro, K., Takamura, M., & Motoki, M. (1993). Formation of  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamyl) lysine cross-link in cured horse mackerel meat induced by drying. *Journal of Food Science*, 58, 1062–1067.
- Kuraishi, C., Sakamoto, J., Yamazaki, J., Suga, Y., Kuhara, C., & Soeda, T. (1997). Production of restructured meat using microbial transglutaminase without salt or cooking. *Journal of Food Science*, 62(3), 488–490, 515.
- Luciano, F. B. (2009). The impacts of lean red meat consumption on human health: a review. *CyTA - Journal of Food*, 7(2), 143–151.
- Martínez, B., Miranda, J. M., Vázquez, B. I., Fente, C. A., Franco, C. A., Rodríguez, J. L., et al. Development of a hamburger patty with healthier lipid formulation and study of its nutritional, sensory and stability properties. *Food Bioprocess Technology*. DOI: 10.1007/s11947-009-0268-x, in press.
- Mason, R. L., Gunst, R. F., & Hess, J. L. (2003). *Statistical design and analysis of experiments, Eighth Applications to Engineering and Science* (second ed.). New York: Wiley.
- Mata, P., & Ortega, R. M. (2003). Omega-3 fatty acids in the prevention and control of cardiovascular disease. *European Journal of Clinical Nutrition*, 57(1), S22–S25.

- Morrison, W. R., & Smith, L. M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipids with boron fluoride–methanol. *Journal of Lipid Research*, 4, 600–608.
- Noriega-Rodríguez, J. A., Ortega-García, J., Angulo-Guerrero, O., García, H. S., Medina-Juárez, L. A., & Cámez-Meza, N. (2009). Oil production from sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *CyTA - Journal of Food*, 7(3), 173–179.
- Ramírez, J. A., Del-Ángel, A., Velázquez, G., & Vázquez, M. (2006). Production of low-salt restructured fish products from mexican flounder (*Cyclopssetta chittendeni*) using microbial transglutaminase or whey protein concentrate as binders. *European Food Research and Technology*, 223(3), 341–345.
- Seki, N., Nozawa, H., & Shaowei, N. (1998). Effect of transglutaminase on the gelation of heat-denatured surimi. *Fish Science*, 64(6), 959–963.
- Simopoulos, A. P. (2002). The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 56(8), 365–379.
- Suman, S., & Sharma, B. (2003). Effect of grind size and levels on the physico-chemical and sensory characteristics of low-fat ground buffalo meat patties. *Meat Science*, 65, 973–976.
- Sun, X. D. (2009). Utilization of restructuring technology in the production of meat products: a review. *CyTA - Journal of Food*, 7(2), 153–162.
- Troy, D., Desmond, E., & Buckley, D. (1999). Eating quality of low-fat beef burgers containing fat-replacing functional blends. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79, 507–516.
- Tsai, S. J., Unklesbay, N., Unklesbay, K., & Clarke, A. (2002). Water and absorptive properties of restructured beef products with five binders at four isothermal temperatures. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 31(1), 78–83.
- Weber, P., Steinhart, H., & Paschke, A. (2009). Determination of the bovine food allergen casein in White wines by quantitative indirect ELISA, SDS-PAGE, Western blot and Immunostaining. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8399–8405.
- Wood, J. D., Enser, M., Fisher, A. V., Nute, G. R., Sheard, P. R., Richardson, R. I., et al. (2008). Fat deposition fatty acid composition and meat quality: a review. *Meat Science*, 78, 343–358.
- World Health Organization (WHO). (2003). *Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases*. WHO technical report series 916. Geneva, Switzerland.



**4.3. Diferenciación entre rodaballo cultivado y salvaje (*Psetta maxima*): contenido proximal y lipídico, composición en minerales traza y resistencia a antibióticos de las bacterias contaminantes.**

**Differentiation of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*): proximate and lipid content, trace mineral composition and antimicrobial resistance of contaminant bacteria.**

B. Martínez, J.M. Miranda, C. Nebot, J.L. Rodríguez, A. Cepeda and C.M. Franco

Food Science and Technology International, 16 (5): 435–441



## Resumen

El pescado es un alimento con reconocidas propiedades funcionales *per se*, y es además una parte fundamental de nuestra Dieta Atlántica. No obstante, debido a la sobreexplotación de los bancos de pesca tradicionales y al consecuente encarecimiento de estos alimentos, el consumo de pescado procedente de la acuicultura se ha incrementado notablemente en las últimas décadas. No obstante, el diferente hábitat y alimentación del pescado cultivado y el procedente de la pesca extractiva hacen que su composición nutricional pueda ser diferente, por lo que es importante disponer de datos científicos que demuestren si ambos productos pueden ser equiparados desde el punto de vista nutricional.

En el presente trabajo fueron evaluadas la composición proximal, el contenido en colesterol, la composición en ácidos grasos y el contenido en minerales traza de la carne de rodaballo (*Psetta maxima*), tanto de cultivo como salvaje.

Adicionalmente, fueron aisladas del músculo de los mismos rodaballos, un total de 144 cepas de *Pseudomonas spp.* y 127 de *Aeromonas spp.*, y se estudió su susceptibilidad a 12 antibióticos, utilizando el método de difusión de disco.

El rodaballo cultivado presentó valores significativamente mayores de grasa, colesterol y calorías, así como un contenido más bajo de humedad que su homólogo salvaje.

El perfil de ácidos grasos de rodaballo cultivado incluyó niveles más altos de los ácidos, mirístico (14:0), pentadecaenoico (15:0), palmitoleico (16:1n-7), gadoleico (20:1n-9), cetoleico (22:1n-11), linoleico (18:2n-6), ALA (18:3n-3), estearidónico (18:4n-3), eicosadienoico (20:2n-6), y EPA (20:5n-3), y niveles más bajos de los ácidos, esteárico (18:0), ARA (20:4n-6), DPA (22:5n-3) y DHA (22:6n-3) que su homólogo salvaje. La proporción de AGPI y la relación n-3/n-6 fueron más altas en el rodaballo salvaje que en el rodaballo cultivado, aunque este último valor estuvo en ambos casos muy por encima de las recomendaciones (1/6). Por otra parte, el rodaballo procedente de la acuicultura presenta mayores valores de AGS y AGMI que el salvaje.

Con respecto a los minerales traza, en el caso de los oligoelementos esenciales determinados Co, Fe, Cu, Mn, Zn y Cr, para todos ellos excepto para el Cr los niveles más altos se encontraron en los especímenes procedentes de la acuicultura. Para los metales pesados determinados Cd y Pb, los niveles más altos aparecieron también en las muestras de rodaballo de cultivo, pero hay que destacar, que tanto para el caso de metales pesados como para el de oligoelementos esenciales, no se encontraron niveles tóxicos de ninguno de ellos en ambos tipos de rodaballo.

La resistencia de las cepas aisladas de *Pseudomonas spp.* y de *Aeromonas spp.* fueron bastante similares, sólo la resistencia a trimetoprim-sulfametoxazol de las cepas de *Aeromonas spp.* Aisladas de rodaballo de cultivo presentaron resistencias mayores que las aisladas de rodaballo salvaje. En el caso de ampicilina, las cepas aisladas de *Pseudomonas spp.* del rodaballo salvaje mostraron niveles más altos de resistencia que aisladas de sus homólogos de cultivo.

En conclusión, los parámetros nutricionales del rodaballo salvaje son más adecuados con respecto a las recomendaciones nutricionales, y aunque el rodaballo cultivado es también una excelente fuente de ácidos grasos *n*-3, su composición nutricional es mejorable. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la seguridad alimentaria derivadas de las concentraciones de minerales traza ni de la resistencia a antibióticos de las cepas aisladas, ni para el rodaballo salvaje ni para el de cultivo.

# Differentiation of Farmed and Wild Turbot (*Psetta maxima*): Proximate Chemical Composition, Fatty Acid Profile, Trace Minerals and Antimicrobial Resistance of Contaminant Bacteria

B. Martínez,<sup>1</sup> J.M. Miranda,<sup>1,\*</sup> C. Nebot,<sup>1</sup> J.L. Rodríguez,<sup>2</sup>  
A. Cepeda<sup>1</sup> and C.M. Franco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Higiene Inspección y Control de Alimentos, Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario s/n. 27002 Lugo, Spain

<sup>2</sup>Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Campus Universitario s/n, 27002 Lugo, Spain

The proximate, cholesterol, fatty acid and trace mineral compositions in the flesh of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*) were evaluated. Additionally, the potential influence of the use of antimicrobial agents in the bacteria carried by farmed turbot was investigated. For this purpose, a total of 144 *Pseudomonas* spp. and 127 *Aeromonas* spp. were isolated and tested for their susceptibility to 12 antimicrobials by a disk diffusion method. Farmed turbot contained higher fat, cholesterol and calories as well as lower moisture content than its wild counterpart. The fatty acid profile of farmed turbot included higher levels of myristic, pentadecanoic, palmitoleic, gadoleic, cetoleic, linoleic, linolenic, stearidonic, eicosadienoic and eicosapentaenoic acids, and lower levels of stearic, arachidonic, docosapentaenoic and docosahexaenoic acids than its wild counterpart. The proportions of polyunsaturated fatty acids and *n-3/n-6* ratios were higher in wild turbot than in farmed turbot. With respect to trace minerals, no toxic levels were found, and higher amounts of Cd, Co, Cu, Fe, Mn, Pb and Zn, as well as lower amounts of Cr, were found in farmed turbot relative to wild turbot. The antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. and *Aeromonas* spp. were quite similar, with only the trimethoprim-sulfamethoxazole resistance of *Aeromonas* spp. isolated from farmed turbot being higher than those isolated from wild turbot. In the case of ampicillin, *Pseudomonas* spp. isolated from wild turbot showed higher resistance levels than those of their counterparts isolated from farmed turbot. In conclusion, the nutritional parameters of wild turbot are more adequate with respect to nutritional recommendations, while no differences were observed in food safety derived from trace mineral concentrations or the antimicrobial resistance of bacteria isolated from wild and farmed turbot.

**Key Words:** turbot, fatty acids, antimicrobial resistance, trace minerals, food safety

## INTRODUCTION

Fish is an important part of the diet for people around the world and provides an important contribution of high quality proteins, vitamins, and other essential nutrients, such as *n-3* polyunsaturated fatty acids (PUFAs)

and trace minerals. Turbot (*Psetta maxima*) is a marine flatfish of high commercial value widely appreciated in Europe for its firm, white and flavorful flesh. However, consumption of wild turbot has undergone a marked decrease because of its low availability and high cost. In recent years, the increasing production of these species as an aquaculture product has made it more available to consumers (Aubourg et al., 2005). Currently, a considerable proportion of the total European turbot production (about 6000 t annually) comes from aquaculture, principally along the Atlantic coast of Spain and France (Busetto et al., 2008).

From a morphological point of view, only an accurate inspection done by a skillful operator could distinguish between wild and farmed turbot, whose blind side

\*To whom correspondence should be sent

(e-mail: josemanuel.miranda@usc.es).

Received 3 September 2009; revised 9 November 2009.

Food Sci Tech Int 2010;16(5):0435-7

© SAGE Publications 2010

Los Angeles, London, New Delhi and Singapore

ISSN: 1082-0132

DOI: 10.1177/1082013210367819

occasionally presents hypermelanosis in the form of dark spots (Busetto et al., 2008). However, wild and farmed fish usually differ in many factors, such as nutritional or chemical composition (Rasmussen et al., 2000). Previous studies have confirmed that the nutritional properties of cultured and wild fish belonging to the same species can be different (Alasalvar et al., 2002; Grigorakis, 2007). Many factors, such as energy consumption, the nature and availability of the food web, catching area, and production technologies, can be important contributors to these variations (Busetto et al., 2008). However, fish diet has been identified as the main reason for the observed differences in nutritional properties (Alasalvar et al., 2002). Usually, commercial feed for turbot contains fish meal, marine oil, wheat or wheat gluten and vegetable oils, whereas wild turbot consume primarily benthic food, such as amphipods, mysid shrimps and small fish (Busetto et al., 2008). As a general rule, cultured fish are characterized by higher fat and *n*-6 fatty acid contents than their wild fish counterparts due to the abundant presence of *n*-6 fatty acids in the plant oil used to partially substitute for fish oil in fish feed formulations (Grigorakis, 2007; Busetto et al., 2008).

Therefore, marine organisms are considered a good source of essential minerals since they absorb minerals from the diet and surrounding water and deposit them in their skeletal tissues and organs. Several studies have indicated that the concentration of minerals in fish is influenced not only by fish species or seasonal factors, but also by biological aspects, such as the fish feed (Alasalvar et al., 2002; Aubourg et al., 2007). Although some minerals are essential micronutrients, toxic elements, such as Cd and Pb can be harmful when ingested over a long time period (Storelli, 2009), and essential elements such as Zn, Cu and Cr can produce toxic effects when intake is excessively high (Goldhaber, 2003).

In addition to their nutritional properties, another important difference between farmed and wild fish is the potential use of antimicrobials in aquaculture. Resistance to antimicrobial agents has been recognized as a major concern in both human and veterinary medicine, and the use of antimicrobial agents is considered the most important factor for the selection and dissemination of antimicrobial agent-resistant bacteria (White, 1998). The risks associated with the use of antibiotics in food-producing animals with respect to the emergence of antibiotic resistance in human pathogens have been widely reported and discussed (White, 1998; Phillips et al., 2004). In addition, it was reported in recent years that the antimicrobial resistance of bacteria isolated from animals in which the use of antimicrobials were restricted in the farming process (such as organic production) is usually lower than that of bacteria isolated from conventional products (Tikofsky et al., 2003; Soonthornchaikul et al., 2006; Miranda et al., 2007;

Miranda et al., 2008). Currently, little information about the influence of antimicrobial treatments used in aquaculture in bacteria carried by farmed fish and very few comparative studies of antimicrobial resistance between bacteria isolated from wild and farmed fish are available.

Consequently, the main objective of this study was to determine the proximate, fatty acid and trace mineral compositions of wild and farmed turbot and to determine the antimicrobial resistance against different antimicrobials of *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp. isolated from wild and farmed turbot muscles sampled from the same geographic region (Galicia, north-western Spain). Such differentiation is considered important if cultured turbot is to be used as a replacement for wild turbot in the European seafood market since Galicia is a very important producer of farmed turbot.

## MATERIALS AND METHODS

### Fish Sampling

Farmed and wild turbot were purchased from the same wholesale fish markets and were selected according to the information contained in fishery product labels according to European Regulations (European Commission, 2001). Only turbot farmed or fished in Galicia were used. Three specimens of wild and farmed turbot were sampled every month for a year ( $n=36$  for each type of turbot) in order to eliminate seasonal variations. The fish were kept in ice chests from sampling until arrival in the laboratory. For both kinds of fish specimens, the length was in the range of 34–42 cm, while the weight was 0.75–1.25 kg. Upon arrival in the laboratory, fish were accurately weighed and measured, and afterwards, the viscera, heads, gills, skin and thorns from all fish were aseptically removed and the muscle of each fish was homogenized. Each individual fish was studied independently in order to carry out the statistical analysis.

### Methods

#### *Bacterial Analysis and Antimicrobial Susceptibility Determination*

To isolate bacteria, 25 g of fish was weighed aseptically, homogenized for 1 min in stomacher bags containing 225 mL of alkaline peptone water (Merck, Darmstadt, Germany) and subsequently homogenized for 1 min. After homogenization, samples were investigated for the presence of *Pseudomonas* spp. and *Aeromonas* spp. Aliquots of 100  $\mu$ L of  $10^{-1}$  to  $10^{-5}$  dilutions of homogenates were plated on glutamate starch phenol red agar (GSP, Merck), and the plates were subsequently incubated at 22 °C for 36 h. After incubation,

yellow colonies were taken as presumptive *Aeromonas* spp. and red-violet colonies were taken as presumptive *Pseudomonas* spp. Two typical isolates of *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp. colonies from each fish sample were picked, transferred onto Columbia agar supplemented with 5% sheep blood (BioMérieux, Marcy l'Étoile, France), and incubated at 22 °C for 36 h in order to obtain pure cultures. All of the isolates were characterized by Gram staining, oxidase and catalase reactions and glucose metabolism. Presumptive *Pseudomonas* spp. and *Aeromonas* spp. were further identified to the species level using API 20 NE identification kits (BioMérieux).

After identification, antimicrobial susceptibility testing was performed for a total of 144 isolates of *Pseudomonas* spp. and 127 isolates of *Aeromonas* spp. Antimicrobial susceptibility testing was carried out by agar disk diffusion on Mueller-Hinton agar plates (Oxoid, Basingstoke, UK) incubated at 22 °C for 48 h according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006) guidelines for testing of bacteria isolated from aquatic animals. Discs containing the following antibacterial agents were used (antimicrobial concentrations in the disk and the inhibition zone diameters for resistant isolates are indicated in parenthesis): ampicillin (10 µg; ≤13 mm), cephalotin (30 µg; ≤14 mm), chloramphenicol (30 µg; ≤12 mm), enrofloxacin (5 µg; ≤16 mm), erythromycin (15 µg; ≤16 mm), florfenicol (30 µg; ≤14 mm), gentamicin (10 µg; ≤12 mm), nalidixic acid (30 µg; ≤13 mm), nitrofurantoin (300 µg; ≤14 mm), oxolonic acid (2 µg; ≤10 mm), oxytetracycline (30 µg; ≤14 mm), and trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 µg; ≤10 mm). Antimicrobial discs were purchased from Oxoid, except florfenicol, which was purchased from Schering-Plough Animal Health (Segre, France). Antimicrobial agents were selected in terms of their different structures and mechanisms of action and they included the most frequent antimicrobials used in aquaculture as well as some antimicrobials banned for use in food-producing animals in the European Union. In the absence of approved breakpoints for the classification of bacteria isolated from fishery products, selective concentrations were chosen according to standards suggested by the CLSI (formerly NCCLS, 2002) or the manufacturer's instructions.

*Escherichia coli* ATCC 25922 and *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* ATCC 33658 were used as reference strains for this study.

#### Proximate Composition, Fatty Acid Profile and Cholesterol Content

All analyses for proximate composition, fatty acid profile and cholesterol content were performed using standard methods (AOAC, 2002). The moisture content was determined by drying samples in a Selecta oven (Barcelona, Spain) to constant weight. Total protein

was determined by the Kjeldahl method, and a factor of 6.25 was used to convert total nitrogen to crude protein. The samples were digested using a Kjeltec 1007 digester (Tecator, Höganäs, Sweden) and distilled using a Kjeltec 1026 distilling unit (Tecator). The lipid content was determined by extraction with diethyl ether/petroleum benzene (1/1, v/v) in a Soxtec System HT 1043 (Tecator). Ash content was determined by incineration of a sample in an Umega 8-2/1100-1 muffle furnace (Utena, Lithuania).

Cholesterol content was analyzed by means of a Carlo Erba MFC500 gas chromatograph (Milan, Italy) equipped with a BPX5 capillary column (30 m × 0.32 mm i.d. and 0.25 µm film thickness) was used. The oven was heated with a temperature ramp of 180 °C to 280 °C. The temperature of the injection port and the detector were 290 °C and 300 °C, respectively. Cholesterol was identified by comparing its retention time with that of a cholesterol standard (Sigma, St Louis, MO, USA). Quantification was conducted using 5 $\alpha$ -cholestane (Sigma) as an internal standard that was added to the sample as a solution (2 mg/mL) prior to the extraction procedure.

Fatty acid content was determined based on a lipid extract obtained by the Bligh and Dyer (1959) method. Boron trifluoride/methanol was used to obtain fatty acid methyl esters following the method described by Morrison and Smith (1964), which were finally dissolved in hexane. A Hewlett-Packard 6890 series gas chromatograph (Walbronn, Germany) fitted with capillary column DB-WAX (30 m × 0.25 mm i.d. and 0.25 µm film thickness) and flame ionization detection was used. The temperatures of the injection port and the detector were 230 °C and 250 °C, respectively. The sample volume (1 µL) was injected, in splitless mode, under the following GC conditions: the oven temperature was taken to 60 °C and held at that level for 2 min before being increased to 160 °C at a rate of 50 °C/min. It was then held at that level for 2 min before being increased to 170 °C at 1.5 °C/min, then to 185 °C at a rate of 2 °C/min, and finally to 240 at 3 °C/min where it was held for 10 min. The carrier gas was hydrogen, 1.7 mL/min. The methyl esters of fatty acids were identified by comparing the retention times of the peaks in the sample with those of standard pure methyl ester standards run previously (Sigma). A 10 µL solution of Tricosanoic acid (C23:0; Sigma) (0.25 mL/m) was used as an internal standard. Fatty acids' methyl esters were expressed as a percentage of the total methyl ester content.

#### Trace Mineral Analysis

Portions of 0.5 g of turbot muscle were placed in a Teflon digestion vessel with 7 mL of 65% nitric acid (HNO<sub>3</sub>) and 1 mL of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). The samples in the vessel were then digested in a microwave

oven (CEM MARS-5, Matthews, USA) using the following microwave digestion program: 200 psi pressure, 25 min ramp time, 210 °C temperature, 300 W maximum power and 10 min hold time. After cooling, the residue was transferred to 25 mL volumetric flasks and diluted to level with deionized water. After, samples were digested with 4 mL of 1N HNO<sub>3</sub> in glass vessels on a hot plate at 100 °C for 12 h. The residue was transferred to 10 mL volumetric flasks and diluted with deionized water. Before analysis, the samples were filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore). Trace mineral contents were expressed as mg/kg weight. All fish samples were analyzed for Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry (ICP-AES) (Varian Model-Liberty Series II, Victoria, Australia). Merck IV multi-element standard (Merck) solutions were used for the calibration and verification method. Sample blanks were prepared in the laboratory in a similar manner to the field samples.

#### Statistical Analysis

Data from proximate compositions, fatty acid profiles, and cholesterol and trace mineral content were subjected to one-way ANOVA to explore differences between wild and farmed turbot, and differences in mean values were determined using Tukey's test. The distributions of antimicrobial resistant strains between wild and farmed turbot were compared with the  $\chi^2$  test with the Yates' correction. The differences were considered to be significant when *P* was lower than 0.05. All statistical analyses were done with the statistical package SPSS 13.0 for windows (SPSS, Chicago, IL, USA).

## RESULTS AND DISCUSSION

The biometric measurements, proximate compositions and cholesterol contents of wild and farmed turbot are

**Table 1.** Biometric measurements, proximate compositions and cholesterol contents of muscle of wild and farmed turbot.

	Wild (n=36)	Farmed (n=36)	<i>p</i>
Weight (g)	852.4±140.1	976.7±102.9	***
Length (cm)	37.1±2.4	36.0±2.8	ns
Moisture (g 100/g)	78.2±1.8	76.4±1.0	*
Protein (g 100/g)	19.3±1.3	18.9±0.6	ns
Fat (g 100/g)	1.3±0.7	3.5±0.3	***
Ash (g 100/g)	1.2±0.3	1.2±0.3	ns
Energy content (kcal 100/g)	89.1±9.1	123.8±19.3	***
Cholesterol (mg 100/g)	27.6±6.3	38.8±4.5	***

Data are reported as mean values±SD. ns, not significant (*p* > 0.05), \**p* < 0.05, \*\**p* < 0.01, \*\*\**p* < 0.001.

shown in Table 1. As it was previously found by other authors (Busetto et al., 2008), farmed turbot were significantly heavier than wild turbot. The proximate composition of wild turbot was largely compatible with those reported previously (Busetto et al., 2008), while farmed turbot contained higher fat content than those reported previously by other authors (Sérot et al., 1998; Özogul et al., 2006; Busetto et al., 2008). However, it is well known that the fat content of fish can vary widely with season, age and origin of species (Olsson et al., 2003). Additionally, fat content can also vary with the fish zone analyzed (Aubourg et al., 2007). Comparison of compositions of wild and farmed turbot revealed a higher fat and cholesterol content, as well as lower moisture content in farmed turbot than in wild turbot. These results are in accordance with those reported (Busetto et al., 2008), and correlated well with the generally recognized inverse relationship between water and lipid content in fish (Shearer, 1994). As a consequence of its higher fat content, probably due to a high dietary fat level in the feed and reduced activity of the cultured fish, the calorie content of farmed turbot was significantly higher than those of wild turbot. Contrary to results reported by Busetto et al. (2008), no differences were found in protein and ash contents of wild and farmed turbot.

With respect to the fatty acid profile, it has been previously reported that assimilation patterns of dietary fatty acids in fish muscle reflect the content of the dietary lipid sources (Alasalvar et al., 2002). Differences in the fatty acid profile were observed between farmed and wild turbot (Table 2). The percentage of saturated fatty acids (SFAs) was significantly higher in farmed turbot, mainly due to the higher content of myristic acid. This result is in accordance with previously reported results by Aubourg et al. (2007) that found higher SFA content in farmed turbot, but different from those obtained by Busetto et al. (2008), who did not find significant differences between SFAs of wild and farmed turbot, or by Sérot et al. (1998), who obtained higher SFA levels in wild turbot. With respect to the monounsaturated fatty acid fraction (MUFA), higher levels were found in farmed turbot, mainly due to the higher proportions of palmitoleic, gadoleic and cetoleic acids. These are typical fatty acids of fish oils contained in farmed fish feed and are transferred to the muscle of farmed fish (Busetto et al., 2008).

With respect to the polyunsaturated fatty acid fraction, higher levels were found for wild turbot than for farmed turbot. Among this fraction, as was previously found by other authors that compared wild fish with its farmed counterpart (Grigorakis et al., 2002; Busetto et al., 2008), the *n*-6 fraction was significantly higher in cultured fish, mainly due to its higher linoleic acid content. This fatty acid is present in plant oils (such as soybean oil) used in the feed of cultured fish and is accumulated largely unchanged in the lipids of marine

**Table 2.** Fatty acid compositions of muscles from wild and farmed turbot.

Fatty acid (mg/100 mg of total fatty acids)	Wild (n=36)	Farmed (n=36)	p
Myristic 14:0	2.6±0.3	6.3±0.2	***
Pentadecanoic 15:0	0.4±0.1	0.5±0.1	*
Palmitic 16:0	16.2±0.4	15.8±0.6	ns
Heptadecenoic 17:0	0.5±0.1	0.5±0.1	ns
Stearic 18:0	3.9±0.4	3.0±0.2	**
ΣSFA	24.5±0.6	26.7±0.6	**
Palmitoleic 16:1n-7	4.2±0.6	5.6±0.4	*
Vaccenic 18:1n-7	2.6±0.2	2.7±0.1	ns
Oleic 18:1n-9	15.0±1.0	15.4±0.8	ns
Gadoleic 20:1n-9	1.0±0.2	1.6±0.1	***
Cetoleic 22:1n-11	0.4±0.2	1.0±0.1	**
ΣMUFA	25.3±2.5	27.4±1.2	*
Hexadecadienoic 16:2n-4	1.9±0.2	1.8±0.1	ns
Linoleic 18:2n-6	2.4±0.7	9.6±0.3	***
Linolenic 18:3n-3	0.5±0.2	1.3±0.1	***
Stearidonic 18:4n-3	0.3±0.1	2.8±0.2	***
Eicosadienoic 20:2n-6	0.4±0.1	0.6±0.1	**
Arachidonic 20:4n-6	2.6±0.2	1.0±0.1	***
Eicosapentaenoic 20:5n-3	8.8±0.3	12.9±0.2	***
Docosapentaenoic 22:5n-3	5.5±0.3	4.6±0.1	**
Docosahexaenoic 22:6n-3	25.1±1.4	12.0±0.8	***
Σn-6	5.3±0.7	11.6±0.4	***
Σn-3	41.0±1.2	34.5±0.7	***
ΣPUFA	50.2±1.1	45.9±0.6	**
ΣPUFA/SFA	1.7±0.2	1.8±0.1	*
n-3/n-6	7.8±1.0	3.0±0.5	***

Data are reported as mean values ± SD. Only fatty acids that reach ≥ 0.50 mg/100 mg of total fat in some group are shown. ns, not significant (p > 0.05), \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

fish due to their reduced capacity for chain elongation and desaturation (Alasalvar et al., 2002). Among the n-3 fraction, although the concentrations of linolenic, stearidonic and eicosapentaenoic acids were higher in farmed than in wild turbot, the higher concentrations of docosapentaenoic and especially of docosahexaenoic acids in wild turbot than in farmed counterparts meant that the n-3 fraction was higher in wild turbot. A majority of the Western population does not consume adequate levels of n-3 fatty acids through natural dietary sources, such as fish. In this sense, a great interest has been accorded recently to the n-3/n-6 ratio of foods included in the human diet, since its value has shown a great effect on the development of certain health problems (WHO, 2003), with the recommended ratio for the whole diet nearer to 1 : 6 (Simopoulos et al., 1999). In this study, the site comparison showed a lower n-3/n-6 ratio in farmed than in wild fish, in accordance with data obtained previously by other authors (Sérot et al., 1998; Alasalvar et al., 2002; Gígorakis et al., 2002; Aubourg et al., 2007). Thus, despite farmed turbot being a good source of n-3 fatty acids, its lower proportions compared to wild turbot reduces the nutritional quality of their lipid components.

**Table 3.** Contents of trace minerals (mg/kg) in the flesh of farmed and wild turbot.

Trace mineral (mg/kg)	Wild Turbot (n=36)	Farmed Turbot (n=36)	p
Cadmium	<0.1±0.0	<0.1±0.0	**
Cobalt	<0.1±0.0	<0.1±0.0	***
Chromium	0.3±0.1	0.2±0.0	*
Copper	0.1±0.0	0.1±0.0	***
Iron	0.8±0.1	2.2±0.5	***
Manganese	<0.1±0.0	0.1±0.0	***
Nickel	0.1±0.0	0.1±0.0	ns
Lead	<0.1±0.0	0.1±0.0	***
Zinc	1.2±0.1	1.9±0.1	**

Data are reported as mean values ± SD. ns: not significant (p > 0.05), \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001.

Trace mineral contents obtained are expressed in Table 3. Mineral accumulation in fish is species-dependent. However, feeding habits and life styles of species are strongly related to accumulation of minerals in fish tissues (Uysal et al., 2008). As was previously found by Aubourg et al. (2007), for most minerals tested (except Cr and Ni), farmed turbot muscle contained higher levels than wild turbot muscle. Levels of trace minerals (Cd and Pb) were below maximum levels in both wild and farmed turbot according to European Regulations (European Commission, 2008). With respect to essential minerals, Zn and Cu reached higher levels in farmed turbot while Cr reached higher levels in wild turbot and no differences were obtained in the case of Ni.

Together with the increment of aquaculture production, in recent years, the use of antimicrobials in aquaculture has increased (DANMAP, 2007). The antibiotic resistance of bacterial isolates of animal origin can represent a potential hazard to consumers via food-borne infections caused by antibiotic-resistant bacteria, and can also contribute resistance genes to endogenous human bacteria (Van den Bogaard et al., 2001).

It was reported that the use of antimicrobials in farming of terrestrial animals is related to antimicrobial resistance rates of bacteria isolated from meat (White, 1998; Soonthornchaikul et al., 2006; Miranda et al., 2007; Miranda et al., 2008), although this relation has been not found for other foods, such as cheese (Miranda et al., 2009). Usually, antimicrobials in aquaculture are used against infections caused by *Vibrio* spp. and *A. salmonicida* (Lunestad and Samuelsen, 2001), and the most used antimicrobials are sulfonamide/trimethoprim (DANMAP, 2007) or quinolones (Lunestad and Samuelsen, 2001; Grave et al., 2008).

The antimicrobial resistance of *Pseudomonas* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from wild and farmed turbot are shown in Table 4. Although data about antimicrobial resistance rates of bacterial isolates from fish and fishery products are very scarce, the antimicrobial resistance rates obtained in this study are significantly lower

**Table 4.** Numbers and percentages of *Pseudomonas* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from wild and farmed turbot resistant to antimicrobial agents by disc diffusion methods.

Antimicrobial agent ( $\mu\text{g}$ )	Wild turbot		Farmed turbot	
	<i>Pseudomonas</i> spp. (n = 72)	<i>Aeromonas</i> spp. (n = 57)	<i>Pseudomonas</i> spp. (n = 72)	<i>Aeromonas</i> spp. (n = 70)
Ampicillin (10)	15 (20.8) a	11 (19.3)	5 (6.9) b	13 (18.6)
Cefotaxime (30)	4 (5.6)	8 (14.1)	2 (2.8)	7 (10)
Chloramphenicol (30)	26 (36.1)	12 (21.1)	28 (38.9)	15 (21.4)
Enrofloxacin (5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Erythromycin (15)	21 (29.2)	14 (24.6)	25 (34.7)	17 (24.3)
Florfenicol (30)	30 (41.7)	21 (36.8)	32 (44.4)	35 (50)
Gentamicin (10)	1 (1.4)	2 (3.5)	0 (0)	0 (0)
Nalidixic acid (30)	19 (26.4) A	6 (10.5) B	21 (29.2)	16 (22.9)
Nitrofurantoin (300)	7 (9.7) A	0 (0) B	5 (6.9)	1 (1.4)
Oxolinic acid (2)	4 (5.6)	0 (0)	2 (2.8)	0 (0)
Oxytetracycline (30)	2 (2.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Trimethoprim-sulfamethoxazole (1.25/23.75 $\mu\text{g}$ )	27 (37.5)	24 (42.1) b	36 (50)	53 (75.7) a

Values for the same fish type with different capital letters in the same row are different ( $p < 0.05$ ).

Values for the same bacterial species with different small letters in the same row are different ( $p < 0.05$ ).

than those obtained by other authors (Akinbowale et al., 2006; Akinbowale et al., 2007) for *Pseudomonas* spp. and *Aeromonas* spp., especially in the case of  $\beta$ -lactams. Contrariwise to the results reported by Akinbowale et al. (2007), who obtained higher resistance rates in *Pseudomonas* spp. than in *Aeromonas* spp. isolates, in this study, resistance rates obtained for *Aeromonas* spp. and *Pseudomonas* spp. were quite similar. The only exceptions were nalidixic acid and nitrofurantoin, which *Pseudomonas* spp. isolates from wild turbot were significantly more resistant than *Aeromonas* spp. isolated from wild turbot.

Additionally, no differences in resistance rates were observed between both *Pseudomonas* spp. and *Aeromonas* spp. isolated from wild and farmed turbot, except for the cases of ampicillin resistance, which was higher in *Pseudomonas* spp. isolated from wild turbot than their counterparts isolated from farmed turbot, and for the case of trimethoprim-sulfamethoxazole-resistance, which was higher in *Aeromonas* spp. isolated from farmed turbot than their counterparts isolated from wild turbot. Thus, in view of the results obtained, evidence of higher resistance in bacteria isolated from farmed fish as a consequence of the possible use of antimicrobials during the production process cannot be deduced.

In summary, the results obtained from this study indicate that nutritional parameters of wild turbot are more adequate to the nutritionist's recommendations than those of farmed turbot, since wild turbot contains lower amounts of cholesterol, fat and SFAs and a more adequate  $n-3/n-6$  ratio than farmed turbot. However, from a food safety point of view, no differences can be observed between farmed and wild turbot.

No toxicity derived from trace mineral levels were observed in any of the groups tested, and amounts of some essential minerals, such as Zn and Cu, were higher in farmed turbot than in their wild counterparts. Additionally, no evidence of higher antimicrobial resistance in bacteria isolated from farmed turbot than in isolates derived from wild turbot could be observed.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Xunta de Galicia for providing financial support (project PGIDIT05TAL003E). The authors also thank Carmen Carreira for her expert technical assistance.

## REFERENCES

- Alasalvar C., Taylor K.D.A., Zubcov E., Shahidi F. and Alexis M. (2002). Differentiation of cultured and wild sea bass (*Dicentrarchus labrax*): total lipid content, fatty acid and trace mineral composition. *Food Chemistry* **79**: 145–150.
- Akinbowale O.L., Peng H. and Barton M.D. (2006). Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *Journal of Applied Microbiology* **100**: 1103–1113.
- Akinbowale O.L., Peng H., Grant P. and Barton M.D. (2007). Antibiotic and heavy metal resistance in motile aeromonads and pseudomonads from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) farms in Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents* **30**: 177–182.
- AOAC (2002). *Official Methods of Analysis*. 17th edn, Gaithersburg, MD: AOAC.
- Aubourg S.P., Losada V. and Prego R. (2007). Distribution of lipids and trace minerals in different muscle sites of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*). *International Journal of Food Science and Technology* **42**: 1456–1464.

- Aubourg S.P., Piñeiro C., Gallardo J.M. and Barros-Velazquez J.B. (2005). Biochemical changes and quality loss during chilled storage of farmed turbot (*Psetta máxima*). *Food Chemistry* **90**: 445–452.
- Bligh E.G. and Dyer W.J. (1959). A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* **42**: 371–386.
- Busetto M.L., Moretti V.M., Moreno-Rojas J.M., Caprino F., Giani I., Malandra R., Bellagamba F. and Guillou C. (2008). Authentication of farmed and wild turbot (*Psetta maxima*) by fatty acid and isotopic analyses combined with chemometrics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **56**: 2742–2750.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2006). *Methods for Antimicrobial Disk Susceptibility Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals*. Wayne, PA: CLSI, Approved guideline M42-A.
- Danish Integrated Antimicrobial Resistance Monitoring and Research Programme (DANMAP) (2007). *Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, foods and humans in Denmark*. Danish Institute for Food and Veterinary Research, Søborg: DANMAP.
- European Commission (2001). *Commission Regulation No. 2065/2001 of October 2001 laying down detailed rules for the application of Council Regulation (EC) No. 104/2000 as regards informing consumers about fishery and aquaculture products*. Brussels: EC.
- European Commission (2008). *Commission Regulation No. 629/2008 of 2 July 2008 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs*. Brussels: EC.
- Grave K., Hansen M.K., Kruse H., Bangen M. and Kritoffersen A.B. (2008). Prescription of antimicrobial drugs in Norwegian aquaculture with an emphasis on “new” fish species. *Preventive Veterinary Medicine* **83**: 156–169.
- Grigorakis K., Alexis M.N., Taylor K.D.A. and Hole M. (2002). Comparison of wild and cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata*); composition, appearance and seasonal variations. *International Journal of Food Science and Technology* **37**: 477–484.
- Grigorakis K. (2007). Compositional and organoleptic quality of farmed and wild gilthead sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and factors affecting it: a review. *Aquaculture* **27**: 55–75.
- Goldhaber S.B. (2003). Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **38**: 232–242.
- Lunestad B.T. and Samuelsen O.B. (2001). Effects of sea water on the activity of antimicrobial agents used in aquaculture; implications for MIC testing. *Aquaculture* **196**: 319–323.
- Miranda J.M., Guarddon M., Mondragón A., Vázquez B.I., Fente C.A., Cepeda A. and Franco C.M. (2007). Antimicrobial resistance in *Enterococcus* spp. strains isolated from organic chicken, conventional chicken, and turkey meat: a comparative survey. *Journal of Food Protection* **70**: 1021–1024.
- Miranda J.M., Guarddon M., Vázquez B.I., Fente C.A., Barros-Velázquez J., Cepeda A. and Franco C.M. (2008). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: a comparative survey. *Food Control* **226**: 371–375.
- Miranda J.M., Mondragón A., Vázquez B.I., Fente C.A., Cepeda A. and Franco C.M. (2009). Microbiological quality and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* isolated from conventional and organic “Arzúa-Ulloa” cheese. *CyTA-Journal of Food* **7**: 103–110.
- Morrison W.R. and Smith L.M. (1964). Preparation of fatty acid methyl esters and dimethylacetals from lipid with boron fluoride-methanol. *Journal of Lipid Research* **5**: 600–608.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2002). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing*. Wayne, PA: NCCLS, 12th Informational Supplement M100-S12.
- Olsson G.B., Olsen R.L., Carlehog M. and Ofstad R. (2003). Seasonal variations in chemical and sensory characteristics of farmed and wild Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). *Aquaculture* **217**: 191–205.
- Özogul Y., Özogul F., Kuley E., Özkutuk A.S., Gökbulut C. and Kóse S. (2006). Biochemical, sensory and microbiological attributes of wild turbot (*Scophthalmus maximus*), from the Black Sea, during chilled storage. *Food Chemistry* **99**: 752–758.
- Phillips I., Casewell M., Cox T., De Groot B., Friis C., Jones R., Nightingale C., Preston R. and Waddell J. (2004). Does the use of antimicrobials in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **53**: 28–52.
- Rasmussen R.S., Ostfeld T.H., Rosholt B. and Mc Lean E. (2000). Manipulation of end-product quality in rainbow trout with finishing diets. *Aquaculture Nutrition* **6**: 17–23.
- Sérot T., Gandemer G. and Demaimay M. (1998). Lipid and fatty acid compositions of muscle from farmed and wild adult turbot. *Aquaculture International* **6**: 331–343.
- Shearer K.D. (1994). Factors affecting the proximate composition of cultured fishes with emphasis on salmonids. *Aquaculture* **119**: 63–88.
- Simopoulos A.P., Leaf A. and Salem N. (1999). Workshop on the essentiality and recommended dietary intakes for Omega-6 and Omega-3 fatty acids. *Journal of the American College of Nutrition* **18**: 487–489.
- Soonthornchaikul N., Garelick H., Jones H., Jacobs J., Ball D. and Choudhury M. (2006). Resistance to three antimicrobial agents of *Campylobacter* isolated from organically- and intensively-reared chickens purchased from retail outlets. *International Journal of Antimicrobial Agents* **27**: 125–130.
- Storelli M.M. (2009). Intake of essential minerals and metals via consumption of seafood from the Mediterranean sea. *Journal of Food Protection* **72**: 1116–1120.
- Tikofsky L.L., Barlow J.W., Santiesteban C. and Schukken Y.H. (2003). A comparison of antimicrobial susceptibility patterns for *Staphylococcus aureus* in organic and conventional dairy herds. *Microbial Drug Resistance* **9**: 39–45.
- Uysal K., Emre Y. and Kose E. (2008). The determination of heavy metal accumulation ratios in muscle, skin and gills of some migratory fish species by inductively coupled plasma-optical emission spectrometry (ICP-OES) in Beymelek Lagoon (Antalya/Turkey). *Microchemical Journal* **90**: 67–70.
- Van den Bogaard A.E., London N., Driessen C. and Stobberingh E.E. (2001). Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **47**: 763–771.
- White W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**: 996–997.
- World Health Organization (WHO) (2003). *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*. Geneva: WHO.





**4.4. Desarrollo de un método abreviado para la determinación cuantitativa de ácidos grasos en leche con especial énfasis en los ácidos grasos de cadena larga**

**Development of a simple method for the quantitative determination of fatty acids in milk with special emphasis on long chain fatty acids**

B. Martínez, J.M. Miranda, C.M. Franco, A. Cepeda, J.L. Rodríguez

CyTA – Journal of Food, Accepted.





UNIVERSIDADE DE  
SANTIAGO DE COMPOSTELA

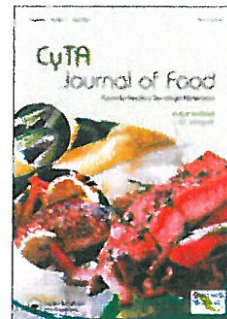
Escola Politécnica Superior

Campus Universitario  
27002 - LUGO  
Tel. 982/252303 / 252231  
Fax. 982/2-41835

CyTA - Journal of Food



Taylor & Francis  
Taylor & Francis Group



To whom it may concern;

Dr. Manuel Vázquez, Professor of Food Technology in the Department of Food Technology at the University of Santiago de Compostela, as editor in chief of the Journal CyTA - Journal of Food, hereby certifies that the following manuscript was accepted in the journal CyTA - Journal of Food.

**Title: Development of a simple method for the quantitative determination of fatty acids in milk with special emphasis on long chain fatty acids**

**Authors: Miranda, Jose; Martinez, Beatriz; Franco, Carlos; Cepeda, Alberto; Rodriguez, Jose**

Manuel Vazquez

Professor's Signature \_\_\_\_\_

Date December 20, 2010



## *Resumen*

La obtención de una leche natural enriquecida en ácidos grasos *n*-3 a partir de la ración suministrada al ganado vacuno conlleva la comprobación del éxito de la modificación mediante el análisis de la composición en ácidos grasos de la leche. Para realizar este tipo de investigaciones, es necesario procesar una gran cantidad de muestras de leche durante semanas de trabajo, para comprobar los cambios con la alimentación a lo largo del tiempo. Además, la comercialización de una leche de este tipo supone también, una vez que se ha obtenido los datos necesarios para la alimentación adecuada, un riguroso control de calidad del producto para asegurar que cumple las especificaciones requeridas en todo momento. A este hecho debemos añadir la dificultad de que el perfil lipídico de la leche experimenta cambios frecuentes por causas ajenas a la alimentación, como son cambios estacionales y cambios fisiológicos que se producen durante los ciclos de reproducción de las vacas. Por ello, es imprescindible que la metodología empleada en la determinación del perfil lipídico de la leche sea especialmente rápida, a fin de poder modificar de manera inmediata la ración aportada a los animales para corregir estas variaciones externas, o si esto no fuese posible, corregir el etiquetado del producto desarrollado incluyendo la nueva composición.

Mediante este trabajo se ha desarrollado un nuevo método de análisis para la extracción y derivatización de ácidos grasos en muestras de leche. La extracción de los lípidos presentes en 10  $\mu$ L de leche se llevó a cabo en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/metanol manteniendo la mezcla a en oscuridad durante toda la noche a -20 °C. La metilación se ha realizado a 60 °C durante 2 h en la misma solución y los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron recuperados para el análisis cromatográfico mediante la adición de hexano.

El método desarrollado fue optimizado en función del volumen de muestra utilizado, el tiempo de extracción, la temperatura y el tiempo de metilación.

Finalmente, el método simple fue comparado con el método de referencia oficial para la extracción y metilación de los ácidos grasos en muestras de leche. Los resultados obtenidos muestran que, para 21 de los 24 ácidos grasos analizados, las recuperaciones obtenidas por el método desarrollado fueron significativamente mayores que las

obtenidas por el método convencional, especialmente en el caso de los ácidos grasos de cadena más larga (entre los que se encuentran los ácidos grasos *n*-3).

El método simple permite procesar un alto número de muestras al mismo tiempo, minimizando la manipulación de la muestra y consecuentemente, la pérdida de grasa y la contaminación. Además, el método abreviado utiliza materiales sencillos y es menos laborioso que el método tradicional. En conclusión, el método propuesto es simple, rápido, económico y logra buenos resultados, por lo que es especialmente adecuado para el control analítico de las leches enriquecidas en ácidos grasos *n*-3, tanto durante su desarrollo como en la monitorización rutinaria de su perfil lipídico.

**Development of a simple method for the quantitative determination of fatty acids in milk with special emphasis on long chain fatty acids**

**Desarrollo de un método abreviado para la determinación cuantitativa de ácidos grasos en leche con especial énfasis en los ácidos grasos de cadena larga**

B. Martínez<sup>a</sup>, J.M. Miranda<sup>a\*</sup>, C.M. Franco<sup>a</sup>, A. Cepeda<sup>a</sup>, J.L. Rodríguez<sup>b</sup>

<sup>a</sup>*Laboratorio de Higiene Inspección y Control de Alimentos, Dpto. de Química Analítica, Nutrición y Bromatología, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain.*

<sup>b</sup>*Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Santiago de Compostela, Lugo, Spain.*

\*Corresponding author. Email: [josemanuel.miranda@usc.es](mailto:josemanuel.miranda@usc.es); phone +34982252231 ext. 22407; fax + 34982254592

### **Abstract**

A new and simple method was developed for the extraction and derivatization of fatty acid in milk. Lipid extraction of milk was carried out in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/methanol. Methylation was performed for 2 h at 60 °C and fatty acid methyl esters were recovered for chromatographic analysis by the addition of hexane. The method parameters were optimized and the simple method was compared to the official reference procedure for the extraction and methylation of fatty acids in milk samples. For most of the 24 fatty acids determined, similar or significantly higher recoveries were obtained by the simple method than by conventional method. The simple method allows processing a high number of samples at the same time, minimizing the sample manipulation and consequently, the sample loss and contamination. In conclusion, the proposed method is simple, rapid, low-cost and achieves good results.

**Keywords:** fatty acid; milk; bovine; gas chromatography.

## **Resumen**

Un nuevo método abreviado ha sido desarrollado para la extracción y derivatización de ácidos grasos en leche. La extracción de los lípidos de la leche se ha llevado a cabo en H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/metanol. La metilación se ha realizado a 60 °C durante 2 h y los ésteres metílicos de los ácidos grasos fueron recuperados para el análisis cromatográfico mediante la adición de hexano. Los parámetros del método fueron optimizados y el método abreviado fue comparado con el método de referencia para la determinación de ácidos grasos en leche. En la mayor parte de los 24 ácidos grasos analizados, el método abreviado mostró recuperaciones similares o mejores que el método convencional. El método simple permite procesar un alto número de muestras al mismo tiempo, minimizando la manipulación de la muestra y consecuentemente, la pérdida de la misma y su contaminación. En conclusión, el método propuesto es simple, rápido, económico y logra buenos resultados.

**Palabras clave:** ácido graso; leche; bovino; cromatografía de gases

## **Introduction**

Milk consumption is predicted to increase globally over the next twenty years, and it will cover a great proportion of human nutrient requirements as part of an everyday diet (Woods & Fearon, 2009). Due to milk's high frequency of consumption, several milk and dairy products with modified fatty acids (FAs) profile have been developed in recent years to modify the human diet according to the recommendations of health agencies (WHO, 2003). These agencies have recommended to decrease the consumption of food with low content of PUFAs, such as red meats (Luciano, 2009), and to increase the consumption of foods rich in *n*-3 polyunsaturated fatty acids (PUFAs) as a means of reducing the *n*-6/*n*-3 PUFAs ratio of the diet (Garg, Wood, Singh, & Moughan, 2006; WHO, 2003). This ratio is strongly correlated with the risk of developing cancer, as well as cerebrocardiovascular, inflammatory and autoimmune diseases (Alexander, 1998). Additionally, much attention has been directed towards the presence of conjugated linoleic acid isomers (CLAs) in dairy products. It is recognized that CLAs show anticarcinogenic properties as well as other important beneficial effects in human health (Belury, 2002).

Modification of the FAs composition of milk is achieved mainly through changes in cattle diet or by the addition of exogenous fat with high content of PUFAs (Castañeda-Gutiérrez, de Veth, Lock, Dwyer, Murphy, & Bauman, 2007; Jimenez, Garcia, & Beristain, 2008), as fish fat (Noriega-Rodriguez, Ortega-Garcia, Angulo-Guerrero, Garcia, Medina-Juarez, & Gamez-Meza, 2009). Rapid and precise analytical methods are necessary when verifying the final FAs profile of these modified products. The determination of FAs in foods is most often carried out by gas chromatography (GC), and usually involves lipid extraction from foods, a derivatization procedure, fatty

acid methyl ester (FAME) extraction and GC determination. This methodology was first proposed by Folch, Lees, & Stanley (1957) who used a chloroform-methanol mixture for the isolation of the total lipid content from animal tissues. However, FAs are polar, low volatility compounds that tend to self-associate or adhere to the walls of GC columns or other surfaces, and the chromatographic separation of non-modified FAs is therefore rather problematic. Thus, a derivatization process is necessary to convert the polar, non-volatile long-chain FAs into methyl ester derivatives that are less polar, relatively volatile and thermally stable (Juárez, Polvillo, Contò, Ficco, Ballico, & Failla, 2008; Rosenfeld, 2002).

In recent years, ISO-IDF 14156 (ISO-IDF, 2001) and ISO-IDF 15884 (ISO-IDF, 2002) have been adopted as official methods for the lipid extraction and preparation of FAMES. However, it is recognized that the conventional methods used for the analysis of FA profiles in a large number of samples are impractical since they are time consuming, require large samples, and consume large amounts of solvents (Araujo, Nguyen, Frøyland, Wang, & Kang, 2008). It has been unambiguously confirmed that the excessive handling caused by multiple steps is responsible for loss of a portion of the lipid phase and contamination (Kang & Wang, 2005). For these reasons, fast, low-cost, simple, accurate and less wasteful methods for determining FA concentrations in milk and dairy products are necessary.

Sulfuric acid has been used as a catalyst to prepare isopropyl esters in milk lipids, but the method has also resulted in extensive isomerization of conjugated dienes and artifact formation, just as for HCl/methanol. Although it has not yet been thoroughly investigated, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in methanol has yielded encouraging results (Luna, Juárez, & de la Fuente, 2008). On the other hand, base methylation is the commonly used procedure to

methylate milk lipids. This procedure requires strict anhydrous conditions (Carvalho & Malcata, 2005), and for this reason it is difficult to apply to raw milk samples directly.

The aim of this work was to develop a simple extraction-derivatization method prior to GC analysis for the quantitative determination of the FA composition in milk, with direct lipids extraction and without solvent removal. In this method, small amounts of sample and solvent are used for extraction and derivatization in a unique step. The proposed simple method was compared to the official reference procedures for extraction and methylation during analysis of the FA content in milk (ISO-IDF, 2001; ISO-IDF, 2002). The advantages, disadvantages and applications of the proposed method are discussed.

## **Materials and methods**

### ***Reagents***

All reagents and solvents were of analytical or HPLC grade. Ethanol, diethyl ether, ammonia solution, sodium sulfate anhydrous, sodium chloride, potassium hydroxide, sulfuric acid, methanol, *n*-pentane and *n*-hexane were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Chloroform was purchased from Scharlau Chemie (Barcelona, Spain). Ultrapure water (Milli-Q plus system, Millipore, Bedford, MA, USA) was used throughout the study.

### ***Standard solution and milk samples***

FAME standard mixtures (C4:0 to C24:0) and individual FAMES (*cis*-9, *trans*-11 CLA isomer, C18:1*n*-7, C22:5*n*-3 and methyl nonadecanoate as internal standard) were purchased from Supelco (Bellefonte, PA, USA). To prepare the stock solution, the

individual FAMES and the FAMES standard mixture were mixed and diluted in *n*-hexane.

Bovine raw milk samples were obtained from a single farm owned by a Galician dairy company (Feiraco Soc. Coop. Ltda, A Coruña, Spain). The total fat content in these milk samples was determined by triplicate analyses according to Gerber's method (British Standards Institution, 1955). In all cases, the total fat content was between 32 and 34 g kg<sup>-1</sup> of milk. Milk samples employed in the optimization of simple method were different due to the difficulty to conserve the raw milk during the time of execution of this work. Comparison of simple and conventional methods was conducted analyzing the same 9 milk sample by each method.

#### ***Instrumentation and analytical conditions***

Separation and quantification of the FAMES were carried out using a 6850 GC system (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) and a DB-Wax capillary column (30 m, 0.25 mm id. 0.25 µm film thickness) (Chrom Tech, Richmond, CA, USA).

The chromatographic conditions were as follows: the initial oven temperature was 35 °C, where it was held for 2 min and then increased to 100 °C at a rate of 30 °C min<sup>-1</sup>. The oven temperature was then increased to 225 °C at 5 °C min<sup>-1</sup>, where it was held for 10 min. The injection port and detector temperatures were set to 250 and 300 °C, respectively. Helium was used as a carrier gas at a flow rate of 1.8 mL min<sup>-1</sup>. The split ratio was 10:1, and 1 µL of solution was injected. The data were recorded by integrator Software GC ChemStation version B.03.02 (Agilent Technologies).

### ***Conventional method***

Milk samples were homogenized by shaking for 10 min in a water bath at 38 °C. Extractions following the conventional method were performed as outlined by ISO-IDF 14156 (ISO-IDF, 2001). An aliquot of sample (100 mL) was mixed with ethanol, NH<sub>3</sub> (aq) and peroxide-free diethyl ether. The funnel was shaken vigorously for 1 min and let stand to achieve phase separation. *n*-pentane was added, mixed carefully and left for phase separation. After discarding the aqueous layer, a Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution were added to the funnel, mixed, and left to undergo phase separation. This step was repeated twice, the remaining organic layer was transferred to a conical flask, and anhydrous sodium sulfate was added. The contents of the conical flask were mixed, allowed to stand for 10 min, filtered and evaporated in a water bath at 50 °C and under reduced pressure using an R200 Buchi (Flawill, Switzerland) rotary evaporator. The separated lipids were exposed to a stream of N<sub>2</sub>, and the FAMES were prepared by base-catalyzed methanolysis of the glycerides using KOH in methanol as described in ISO-IDF 15884 (ISO-IDF, 2002).

### ***Simple method***

Milk samples were homogenized as described above. An aliquot of milk sample (10 µL) was placed in a tube sealed with a Teflon-lined cap, and 40 µL of a solution of nonadecanoic acid was added as internal standard. The solvent was evaporated with nitrogen (5 min, at 38°C), and 2 mL of a 25 mL L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> solution in methanol was added. The tube was shaken for 30 s and stored in darkness at -20 °C overnight (12-16 h) for lipids extraction. After that, methylation was carried out in a water bath for 2 h at 60 °C. Then, 2 mL of a saturated NaCl solution and 1 mL of *n*-hexane were added; the mixture was shaken for 30 s and centrifuged (10 min at 2000 rpm). The aqueous layer

was removed, and a small amount of anhydrous sodium sulfate was added to eliminate any water residue. To avoid any loss of short-chain FAMES, the hexane layer was not evaporated.

#### ***Identification, calibration, linearity and limits of the method***

FAMES were identified by comparison of the retention times of the peaks in the sample with those of standard pure compounds. Quantitative analysis was based on the IS method. The relative mass response factor ( $f_i^m$ ) was determined from samples prepared using the stock and the IS solutions, according to the following equation:

$$f_i^m = \frac{A_{is} \times m_i}{A_i \times m_{is}}$$

where  $A_{is}$  is the peak area of the IS,  $m_i$  the mass of component  $i$  ( $\mu\text{g}$ ),  $A_i$  the peak area of the component  $i$  and  $m_{is}$  is the mass of IS ( $\mu\text{g}$ ).

The methyl ester recovery during extraction and processing was determined by adding 40  $\mu\text{L}$  of a 0.25  $\text{mg mL}^{-1}$  solution of nonadecanoic acid (C19:0) (Supelco) in chloroform. The study of the simple method included determination of FID response linearity; detection and quantification limits of the instrument and analytical conditions; and recovery, precision and repeatability. The linearity of the response was determined from triplicate analyses of pure FAMES solutions in *n*-hexane. For this purpose, eight 1:1 dilutions of the stock solution were used. Calibration curves were plotted using diluted solutions with a range of concentrations bracketing the concentration of FAs in the samples. The concentration of individual FAMES in the most concentrated working solution (Std1) was between 96 and 20  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and in the least concentrated working solution (Std8), the concentrations ranged between 0.75 and 0.16  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Table 1). The

curves consisted of a plot of peak area versus concentration. Linear regression analysis of absolute areas versus injected quantities of the FAs was used.

The limit of detection (LOD) was determined as the lowest concentration that gave a signal to noise ratio ( $S/N$ )  $\geq 3$ , and the limit of quantification (LOQ) was determined as the lowest concentration that gave an  $S/N \geq 10$ .

### ***Simple method optimization***

Before studying the simple method and comparing the results obtained by the simple method with those obtained by the conventional method, it was necessary to establish the optimal conditions in terms of sample volume, extraction time, and the time and temperature during methylation. Initially, FAs were extracted from a 50  $\mu\text{L}$  milk sample by adding 2 mL of 25  $\text{mL L}^{-1}$   $\text{H}_2\text{SO}_4$  in methanol. Samples were mixed and stored at -20  $^\circ\text{C}$  for 2 h, and then derivatization was carried out in a water bath at 80  $^\circ\text{C}$  for 1 h as described by Watts & Browse (2002).

For the determination of the ideal amount of sample, the proposed method was assayed using 5, 10, 50 and 100  $\mu\text{L}$  of milk. The FAMES extracted by the hexane layer were diluted before GC analysis in order to inject the same final concentration of FAMES in all cases. The effect of extraction time was studied at 1, 3, 8, 12, 16 and 24 h. Samples were kept in a water bath at 40, 60 and 80  $^\circ\text{C}$  for a period of 1 h to determine the ideal temperature during methylation. After the optimal temperature was established, this procedure was assayed in terms of time for 30 min, 1, 2, 4, 8 and 12 hours in a water bath at 60  $^\circ\text{C}$ .

### ***Repeatability, intermediate precision, and recoveries***

The repeatability (intra-day Relative Standard Deviation (RSD) %) of the simple method was calculated based on the RSD of nine (n=9) complete analyses of the same milk sample under the same experimental conditions by the same operator. The intermediate precision (inter-day RSD %) was established from three complete analyses of the same milk sample on three consecutive days (n=9).

The recovery of the simple method was determined from the complete analysis of nine replicate analyses (n=9) of the same milk sample pre-fortified with the selected pure FA dilutions (Std3, Std4, Std5).

### ***Statistics***

Changes in the measured fatty acid content due to the extraction and methylation conditions were statistically analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA). Post hoc analysis was carried out using Tukey's test. Student's t-test was used to determine differences in the FA content of milk analyzed by conventional and simple methods. Differences were considered to be significant when  $P < 0.05$ . Data analyses were conducted using the SPSS statistical package, version 13.0 for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL, USA).

## **Results and discussion**

### ***Response linearity***

The response linearity for different pure FA standards (Table 1) show an adequate linearity for all analytes, with  $r$  values higher than 0.99. The slope and intercept of the injected FAs were used to calculate the linear FID response of the FAs. The high slope values are indicative of the high detector sensitivity for the different FAs. The LOD and

LOQ for the different pure FAs showed that standard solutions Std7 and Std8 were beyond the quantification limits for C4:0, C6:0, C8:0, *cis9-trans11* CLA and C20:1*n*-9. For the other fatty acids, only standard Std8 was outside the quantification limits. The values for standard solutions outside the quantification limits were not used during further study of the method.

### ***Method optimization***

Upon examination of the importance of sample volume (Table 2), only C15:0 showed high concentrations when using 50  $\mu$ L of sample. However, for most of the FAs, the highest concentrations were obtained using 5 and 10  $\mu$ L of sample. For five FAs (C16:0, C17:0, C17:1*n*-7, C18:1*n*-9 and C20:1*n*-9), significantly higher concentrations were obtained using 10  $\mu$ L than using 5  $\mu$ L. For other FAs (C14:0, C14:1*n*-5, C18:3*n*-3 and C22:5*n*-3), the RSD using a sample volume of 5  $\mu$ L was higher than 10%. Thus, a sample volume of 5  $\mu$ L was considered to be inadequate, and 10  $\mu$ L of milk was chosen as the optimum sample volume.

Once the optimum sample volume was established, the optimum extraction time was investigated (Table 3). The amount of FAs increased with increasing extraction time up to 12-16 h, when the highest values were obtained for all FAs. Significantly higher amounts of FAs were only found at 16 h versus 12 h for C20:0. As a result, overnight extraction (12-16 h) was selected as the optimal extraction time for the method. The extraction procedure was performed in darkness at a temperature of -20 °C in order to prevent FA degradation (Araujo et al., 2008).

The derivatization process was optimized by determining the ideal temperature (Table 4) and reaction time (Table 5). The best results for most of the FAs in milk were obtained at 60 °C and 80 °C. Regarding individual FAs, higher amounts of C20:1*n*-9

were obtained for transmethylation at 80 °C than at 60 °C, but the best results were obtained at 60 °C for *cis-9,trans-11* CLA and C20:0. Taking into account these results and the fact that the process at 60 °C is less aggressive and more energy efficient than at 80 °C, we selected 60 °C as the optimal temperature.

When optimizing derivatization time, the highest FAs quantities were generally obtained at 2 and 4 h. For the shortest FAs (C4:0 and C6:0), higher values were obtained at 1 and 2 h. For C16:0, the results were better at 4 h than at 2 h, but higher concentrations were measured for 8 FAs (C14:1*n*-5, C15:0, C18:0, C18:1*n*-7, C20:0 and C22:5*n*-3) when using a transmethylation time of 2 h. Thus, since a transmethylation time longer than 2 h did not improve the results and was less efficient in terms of time and energy consumption, we chose 2 h as the optimal transmethylation time.

### ***Recovery factor***

The recoveries (*R*) (Table 6) were determined in spiked samples at three different concentrations, corresponding to standards Std3, Std4 and Std5 (Table 1). The highest *R* values were obtained at the intermediate level, and the lowest *R* values were found following spiking similar to the concentration of the least-concentrated standard solution (Std5). For the three different levels, the lowest *R* values were obtained for short chain fatty acids. This is probably due to the loss of volatiles during concentration under the nitrogen stream. The *R* values obtained for this method were between 74.18 and 100.34.

### ***Repeatability and intermediate precision***

The simple method showed repeatability values lower than 7 % (Table 6), except for C4:0. The repeatability values for the method were between 7.00 and 1.04 %. The

intermediate precision for the method had values under 10% except for C18:0, C18:1n-9, C18:1n-7 and C20:1n-9, which showed the greatest RSD. The inter-day RSD varied between 10.94 and 3.09 % for the same sample analyzed in triplicate on three different days.

### ***Comparison with conventional method***

Once the simple method was optimized and recovery, repeatability and intermediate precision were conducted, the developed method was compared to the conventional method by analyzing milk samples. Figure 1 shows the chromatogram of a milk sample obtained by the simple method. The obtained results (Table 7) showed that the FA content obtained by the simple method was significantly lower than those obtained by the conventional method for the cases C4:0 and C6:0 FAs. No significant differences were obtained when milk samples were analyzed by the two methods for the case of C8:0, C10:0, C14:1n-5 and C20:1n-9, whereas for the case of all the other FAs determined, appeared to be higher when using the simple method rather than the conventional method. The differences in the FA content of milk were more evident (2-fold in some cases) for longer-chain FAs than for shorter-chain FAs (except for C20:1n-9). Moreover, the concentration of the longest FAs detected using the conventional method were below the quantification limits of the GC analysis. This finding is in agreement with the fact that the alkali-based transesterification using in the conventional method has two main shortcomings. Free FAs (Carvalho & Malcata, 2005; Golay, Dionisi, Hung, Giuffrida, & Destailats, 2006) and sphingolipids may remain partially unreacted and esters undergo saponification reactions. In presence of methoxide, water yields free hydroxide ions. In presence of these ions, esters and the newly generated FAMES can be hydrolyzed (Juárez et al., 2008). For this reason strict

anhydrous conditions are required (Carvalho & Malcata, 2005). These factors help to explain the poor results found for long-chain FAs in comparison to the simple method. The higher quantities of these FAs obtained through the simple method is a very important factor since modified milks classified as functional foods most frequently contain increased concentrations of *n*-3 polyunsaturated fatty acids and CLAs. These compounds are included in the longer-chain FAs from milk.

Other modified methods, obtained statistically indistinguishable results for most FAs when compared to the conventional method, but they displayed significant advantages in terms of time, chemical usage, and labor (Araujo et al., 2008; Feng, Lock, & Gasnsworthy, 2004; Luna, Juárez, & de la Fuente, 2005). Additionally, other simple methods carried out for other matrices obtained better results than those obtained by traditional methods. This fact is due to the prevention of FA losses by the multiple step handling and high quantities of sample and solvents. (Abdulkadir & Tsuchiya, 2008; Carrapiso, Timón, Petró, Tejada, & García, 2000; Juárez et al., 2008; Meier, Mjøs, Joensen, & Grahl-Nielsen, 2006).

**PLEASE INSERT HERE FIGURE 1**

In conclusion, the method developed in this research obtained better results than the conventional method for detection of the nutritionally important long-chain FAs. In addition, this method decreases the risk of FA loss and sample contamination through reduction in sample handling, and it is suitable for the analysis of large number of samples at the same time. Moreover, the proposed, simple method shows good recoveries and accuracy.

### **Acknowledgments**

The authors thank Consellería do Medio Rural (FEADER 2008/32 and FEADER 2008/33) and Dirección Xeral de Investigación Desenvolvemento e Innovación (Xunta de Galicia, Lucas Labrada program) for financial support.

### **References**

- Abdulkadir, S., & Tsuchiya, M. (2008). One-step method for quantitative and qualitative analysis of fatty acids in marine animal samples. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *354*, 1-8.
- Alexander, J.W. (1998). Immunonutrition: the role of  $\omega$ -3 fatty acids. *Nutrition*, *14*, 627-633.
- Araujo, P., Nguyen, T.T., Frøyland, L., Wang, J., & Kang, J.X. (2008). Evaluation of a rapid method for the quantitative analysis of fatty acids in various matrices. *Journal of Chromatography A*, *1212*, 106-113.
- Belury, M. A. (2002). Dietary conjugated dienoic isomers of linoleic acid in health: physiological effects and mechanisms of action. *Annual Review of Nutrition*, *22*, 505-531.

- Carrapiso, A.I., Timón, M.L., Petró, M.J., Tejada, J.F., & García, C. (2000). In situ transesterification of fatty acids from Iberian pig subcutaneous adipose tissue. *Meat Science*, 56, 159-164.
- Carvalho, A.P., & Malcata, F.X. (2005). Preparation of fatty acid methyl ester for gas-chromatographic analysis of marine lipids: insight studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 5049-5059.
- Castañeda-Gutiérrez, E., de Veth, M.J., Lock, A.L., Dwyer, D.A., Murphy, K.D., & Bauman, D.E. (2007). Effect of supplementation with calcium salts of fish oil on *n*-3 fatty acids in milk fat. *Dairy Science*, 90, 4149-4156.
- British Standards Institution. (1955). *Gerber method for the determination of fat in milk and milk products*. BS 696. London: British Standards Institution.
- Feng, S., Lock, A.L., & Gasnsworthy, P.C. (2004). A rapid lipid separation method for determining fatty acid composition of milk. *Journal of Dairy Science*, 87, 3785-3788.
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G.H.S. (1957). A single method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226, 497-506.
- Garg, M.L., Wood, L.G., Singh, H., & Moughan, P.J. (2006). Means of delivering recommended levels of long chain *n*-3 polyunsaturated fatty acids in human diets. *Journal of Food Science*, 71(6), R66-R71.
- Golay, P.-A., Dionisi, F., Hung, B., Giuffrida, F., & Destailats, F. (2006). Direct quantification of fatty acids in dairy powders with special emphasis on *trans* fatty acid content. *Food Chemistry*, 101, 1115-1120.

International Organization for Standardization-International Dairy Federation (ISO-IDF). (2001). *Milk and milk products-Extraction methods for lipids and liposoluble compounds*. International Standard ISO 14156-IDF 172. Brussels: IDF.

International Organization for Standardization-International Dairy Federation (ISO-IDF). (2002). *Milk fat-preparation of fatty acid methyl esters*. International Standard ISO 15884-IDF 182. Brussels: IDF.

Jimenez, M., Garcia, H.S., & Beristain, C.I. (2008). Sensory evaluation of dairy products supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid (CLA). *LWT - Food Science and Technology*, *41*, 1047-1052.

Juárez, M., Polvillo, O., Contò, M., Ficco, A., Ballico, S., & Failla, S.J. (2008). Comparison of four extraction/methylation analytical methods to measure fatty acid composition by gas chromatography in meat. *Journal of Chromatography A*, *1190*, 327-332.

Kang, J.X., & Wang, J.A. (2005). A simplified method for analysis of polyunsaturated fatty acids. *BMC Biochemistry*, *6*, 5.

Luciano, F.B. (2009). The impacts of lean red meat consumption on human health: a review. *CyTA-Journal of Food*, *7*, 143-151.

Luna, P., Juárez, M., & de la Fuente, M.A. (2005). Validation of a rapid milk fat separation method to determine the fatty acid profile by gas chromatography. *Journal of Dairy Science*, *88*, 3377-3381.

Luna, P., Juárez, M., & de la Fuente, M.A. (2008). Gas chromatography and silver-ion high-performance liquid chromatography analysis of conjugated linoleic acid

- isomers in free fatty acid form using sulphuric acid in methanol as catalyst. *Journal of Chromatography A*, 1204, 110-113.
- Meier, S., Mjøs, S.A., Joensen, H., & Grahl-Nielsen, O. (2006). Validation of a one-step extraction/methylation method for determination of fatty acids and cholesterol in marine tissues. *Journal of Chromatography A*, 1104, 291-298.
- Noriega-Rodriguez, J.A., Ortega-Garcia, J., Angulo-Guerrero, O., Garcia, H.S., Medina-Juarez, L.A., & Gamez-Meza, N. (2009). Oil production from sardine (*Sardinops sagax caerulea*). *CyTA-Journal of Food*, 7, 173-179.
- Rosenfeld, J.M. (2002). Application of analytical derivatizations to the quantitative and qualitative determination of fatty acids. *Analytica Chimica Acta*, 465, 93-100.
- Watts, J., & Browse, J. (2002). Genetic dissection of polyunsaturated fatty acid synthesis in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 5854-5859.
- WHO. (2003). *Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases*. WHO technical report (Vol. 916, pp. 1-149). Geneva: World Health Organization.
- Woods, V.B., & Fearon, A.M. (2009). Dietary sources of unsaturated fatty acids for animals and their transfer into meat, milk and eggs: A review. *Livestock Science*, 126, 1-20.

**Figure captions**

Figure 1. Chromatogram of raw bovine milk sample. Peak identification: (1) C4:0; (2) C6:0; (3) C8:0; (4) C10:0; (5) C12:0; (6) C14:0; (7) C14:1 *n*-5; (8) C15:0; (9) C16:0; (10) C16:1 *n*-7; (11) C17:0; (12) C17:1 *n*-7; (13) C18:0; (14) C18:1 *n*-9; (15) C18:1 *n*-7; (16) C18:2 *cis*-9-12; (17) C18:2 *trans*-9-12; (18) C19:0 (IS); (19) C18:3 *n*-3; (20) *cis*9-*trans*11 CLA; (21) C20:0; (22) C20:1 *n*-9; (23) C20:5 *n*-3; (24) C22:5 *n*-3; (25) C22:6 *n*-3.

Figura 1. Cromatograma de una muestra de leche cruda de vaca. Identificación de los picos: (1) C4:0; (2) C6:0; (3) C8:0; (4) C10:0; (5) C12:0; (6) C14:0; (7) C14:1 *n*-5; (8) C15:0; (9) C16:0; (10) C16:1 *n*-7; (11) C17:0; (12) C17:1 *n*-7; (13) C18:0; (14) C18:1 *n*-9; (15) C18:1 *n*-7; (16) C18:2 *cis*-9-12; (17) C18:2 *trans*-9-12; (18) C19:0 (IS); (19) C18:3 *n*-3; (20) *cis*9-*trans*11 CLA; (21) C20:0; (22) C20:1 *n*-9; (23) C20:5 *n*-3; (24) C22:5 *n*-3; (25) C22:6 *n*-3.

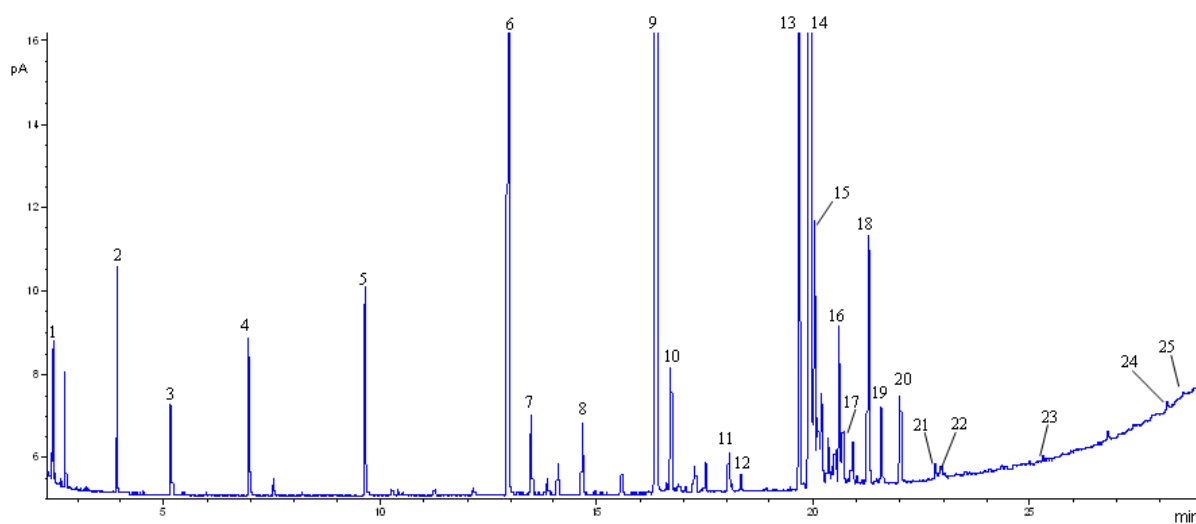


Table 1. Linearity during determination of fatty acids studied by the simple method.

Tabla 1. Linealidad durante la determinación de los ácidos grasos estudiados mediante el método simple.

Fatty acid	$t_R$ (min)	Standards Range Std1-Std8 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Slope	Intercept	r	LOD ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOQ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
C4:0	2.462	64.00-0.50	0.665	-0.630	0.997	1.136	1.953
C6:0	3.918	64.00-0.50	1.570	-1.170	0.998	0.950	1.146
C8:0	5.185	64.00-0.50	2.103	-1.170	0.999	1.024	1.136
C10:0	6.992	64.00-0.50	2.447	-0.789	0.996	0.846	1.000
C12:0	8.252	64.00-0.50	2.806	-0.753	0.998	0.366	0.560
C14:0	11.338	64.00-0.50	2.960	-0.663	0.999	0.204	0.400
C14:1 <i>n</i> -5	13.037	32.00-0.25	2.945	-0.329	0.999	0.120	0.305
C15:0	13.588	32.00-0.25	2.965	-0.327	0.999	0.157	0.333
C16:0	16.475	96.00-0.75	3.079	-0.900	0.999	0.963	1.118
C16:1 <i>n</i> -7	16.826	32.00-0.25	2.980	-0.327	0.999	0.132	0.315
C17:0	18.155	32.00-0.25	2.079	-0.197	0.999	0.192	0.481
C17:1 <i>n</i> -7	18.502	32.00-0.25	2.960	-0.298	0.999	0.174	0.373
C18:0	19.797	64.00-0.50	2.994	-0.553	0.999	0.310	0.511
C18:1 <i>n</i> -9	20.057	64.00-0.50	3.158	-0.505	0.999	0.240	0.437
C18:1 <i>n</i> -7	20.174	32.00-0.25	2.853	-0.327	0.997	0.135	0.324
C18:2 <i>cis</i> -9-12	20.721	32.00-0.25	3.023	-0.316	0.999	0.138	0.347
C18:2 <i>trans</i> -9-12	20.814	32.00-0.25	2.969	-0.292	0.999	0.172	0.381
C18:3 <i>n</i> -3	21.708	32.00-0.25	2.952	-0.212	0.999	0.106	0.323
<i>cis</i> 9- <i>trans</i> 11 CLA	22.420	20.00-0.16	2.950	-0.280	0.999	0.138	0.349
C20:0	22.927	64.00-0.50	2.943	-0.353	0.999	0.318	0.552
C20:1 <i>n</i> -9	23.151	32.00-0.25	2.906	-0.219	0.999	0.221	0.543
C20:5 <i>n</i> -3	25.433	32.00-0.25	2.856	-0.214	0.999	0.092	0.446
C22:5 <i>n</i> -3	28.299	40.00-0.31	2.881	-0.875	0.999	0.083	0.421
C22:6 <i>n</i> -3	28.692	32.00-0.25	2.974	-0.145	0.999	0.082	0.411

$t_R$ : retention time; r: coefficient of correlation; LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification; CLA: conjugated linoleic acid.

$t_R$ : tiempo de retención; r: coeficiente de correlación; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación; CLA: ácido linoleico conjugado.

Table 2. Effect of sample volume on the fatty acid methyl ester content in bovine milk (mg L<sup>-1</sup> of milk) processed by the simple method.

Tabla 2. Efecto del volumen de muestra en el contenido de ácidos grasos en leche de vaca (mg L<sup>-1</sup> de leche) procesada mediante el método abreviado.

Fatty acid	Volume of milk sample			
	5 µL	10 µL	50 µL	100 µL
C4:0	1020.8±39.1 <sup>a</sup>	997.5±27.7 <sup>a</sup>	977.6±23.0 <sup>a</sup>	868.9±53.1 <sup>b</sup>
C6:0	526.1±20.6 <sup>a</sup>	503.8±22.9 <sup>a</sup>	437.5±18.1 <sup>b</sup>	383.2±23.0 <sup>c</sup>
C8:0	292.4±11.9 <sup>a</sup>	296.4±8.9 <sup>a</sup>	272.2±12.2 <sup>a</sup>	222.2±11.2 <sup>b</sup>
C10:0	663.0±25.6 <sup>a</sup>	677.4±17.6 <sup>a</sup>	576.6±27.1 <sup>b</sup>	531.5±25.6 <sup>b</sup>
C12:0	831.2±54.3 <sup>a</sup>	859.5±32.6 <sup>a</sup>	803.4±44.2 <sup>b</sup>	550.6±23.0 <sup>c</sup>
C14:0	2690.2±322.1 <sup>a</sup>	2893.8±16.8 <sup>a</sup>	2899.1±52.7 <sup>a</sup>	1880.3±19.9 <sup>b</sup>
C14:1 <i>n</i> -5	445.1±55.2 <sup>a</sup>	434.2±4.1 <sup>a</sup>	435.7±3.4 <sup>a</sup>	280.6±16.4 <sup>b</sup>
C15:0	263.8±22.1 <sup>b</sup>	240.4±3.1 <sup>c</sup>	273.4±5.8 <sup>a</sup>	170.0±5.9 <sup>d</sup>
C16:0	7794.5±582.1 <sup>b</sup>	8551.4±404.8 <sup>a</sup>	6753.1±56.4 <sup>c</sup>	4208.1±311.7 <sup>d</sup>
C16:1 <i>n</i> -7	842.3±45.6 <sup>a</sup>	830.5±33.7 <sup>a</sup>	714.4±26.0 <sup>b</sup>	388.3±19.4 <sup>c</sup>
C17:0	291.2±18.2 <sup>b</sup>	334.2±3.0 <sup>a</sup>	201.6±3.1 <sup>c</sup>	125.8±9.7 <sup>d</sup>
C17:1 <i>n</i> -7	145.2±14.4 <sup>b</sup>	164.7±11.1 <sup>a</sup>	80.9±4.1 <sup>c</sup>	43.8±0.3 <sup>d</sup>
C18:0	3227.8±232.3 <sup>a</sup>	3126.4±245.2 <sup>a</sup>	2537.3±213.7 <sup>b</sup>	1526.3±106.1 <sup>c</sup>
C18:1 <i>n</i> -9	8122.3±213.4 <sup>b</sup>	8771.6±90.0 <sup>a</sup>	6811.5±130.8 <sup>c</sup>	3313.5±58.1 <sup>d</sup>
C18:1 <i>n</i> -7	2122.3±91.2 <sup>a</sup>	2178.6±81.0 <sup>a</sup>	1649.9±19.1 <sup>b</sup>	788.1±19.1 <sup>c</sup>
C18:2 <i>cis</i> -9-12	1085.6±314.5 <sup>a</sup>	1195.1±91.8 <sup>a</sup>	831.5±60.5 <sup>b</sup>	478.2±7.4 <sup>c</sup>
C18:2 <i>trans</i> -9-12	345.2±27.6 <sup>a</sup>	353.6±7.3 <sup>a</sup>	279.5±20.7 <sup>b</sup>	154.2±1.2 <sup>c</sup>
C18:3 <i>n</i> -3	372.3±45.1 <sup>a</sup>	358.6±24.3 <sup>a</sup>	338.9±5.7 <sup>b</sup>	211.0±11.0 <sup>c</sup>
<i>cis</i> 9- <i>trans</i> 11 CLA	519.1±31.1 <sup>a</sup>	551.5±37.1 <sup>a</sup>	414.4±11.4 <sup>b</sup>	187.2±14.8 <sup>c</sup>
C20:0	55.3±4.1 <sup>a</sup>	56.9±1.4 <sup>a</sup>	< LOQ	< LOQ
C20:1 <i>n</i> -9	61.7±3.4 <sup>b</sup>	67.2±1.8 <sup>a</sup>	54.9±3.5 <sup>c</sup>	< LOQ
C20:5 <i>n</i> -3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ
C22:5 <i>n</i> -3	55.6±13.2 <sup>a</sup>	53.4±1.8 <sup>a</sup>	< LOQ	< LOQ

Values are means ± standard deviation (n=9). <sup>a,b,c,d</sup> Values in the same row with different letters are significantly different. LOQ: limit of quantification; CLA: conjugated linoleic acid. Only fatty acids contents higher than LOQ are reported.

Los valores son media ± desviación estándar (n=9). <sup>a,b,c,d</sup> Los valores en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas. LOQ: límite de cuantificación; CLA: ácido linoleico conjugado. Solo están recogidos aquellos ácidos grasos que presentan valores superiores al LOQ.

Table 3. Effect of the extraction time on the fatty acid methyl ester content of bovine milk ( $\text{mg L}^{-1}$  of milk) processed by the simple method.

Tabla 3. Efecto del tiempo de extracción en el contenido de esteres metílicos de ácidos grasos de leche bovina ( $\text{mg L}^{-1}$  de leche) procesada mediante el método abreviado.

Fatty acid	Time of extraction					
	1h	3 h	8 h	12h	16h	24h
C4:0	1275.7±85.4 <sup>a</sup>	1272.9±63.1 <sup>c</sup>	1602.4±64.4 <sup>b</sup>	2117.8±63.2 <sup>a</sup>	2168.5±36.5 <sup>a</sup>	1374.2±82.5 <sup>c</sup>
C6:0	593.5±12.9 <sup>d</sup>	667.5±9.4 <sup>c</sup>	712.3±20.5 <sup>b</sup>	801.9±24.7 <sup>a</sup>	833.2±17.6 <sup>a</sup>	648.6±16.3 <sup>c</sup>
C8:0	366.7±21.8 <sup>d</sup>	448.1±10.4 <sup>b,c</sup>	467.8±9.5 <sup>b</sup>	559.5±22.5 <sup>a</sup>	529.9±17.8 <sup>a</sup>	416.9±19.6 <sup>c</sup>
C10:0	784.7±29.5 <sup>c</sup>	959.1±30.2 <sup>b</sup>	965.7±28.6 <sup>b</sup>	1163.0±39.7 <sup>a</sup>	1125.2±26.5 <sup>a</sup>	901.1±37.5 <sup>c</sup>
C12:0	986.6±52.3 <sup>b</sup>	996.7±9.7 <sup>b</sup>	1312.1±27.6 <sup>a</sup>	1339.8±73.2 <sup>a</sup>	1320.8±33.9 <sup>a</sup>	1088.9±58.1 <sup>b</sup>
C14:0	2651.2±152.4 <sup>c</sup>	2673.6±13.4 <sup>c</sup>	3174.3±83.4 <sup>a</sup>	3212.2±211.2 <sup>a</sup>	3442.8±92.6 <sup>a</sup>	2907.8±113.4 <sup>b</sup>
C14:1 <i>n</i> -5	275.0±32.3 <sup>b</sup>	286.1±7.9 <sup>b</sup>	337.8±17.6 <sup>a</sup>	341.0±27.8 <sup>a</sup>	358.7±17.2 <sup>a</sup>	298.8±12.4 <sup>b</sup>
C15:0	246.0±11.2 <sup>c</sup>	249.3±1.3 <sup>c</sup>	282.3±6.3 <sup>b</sup>	315.1±21.5 <sup>a</sup>	321.3±4.1 <sup>a</sup>	270.8±9.0 <sup>b</sup>
C16:0	6580.0±211.1 <sup>c</sup>	6713.7±56.1 <sup>c</sup>	7894.5±357.1 <sup>a</sup>	7961.4±389.5 <sup>a</sup>	8739.2±152.7 <sup>a</sup>	7382.5±261.9 <sup>b</sup>
C16:1 <i>n</i> -7	503.9±12.3 <sup>c</sup>	551.1±23.3 <sup>b</sup>	632.4±23.2 <sup>a</sup>	643.1±32.3 <sup>a</sup>	658.4±27.8 <sup>a</sup>	554.4±23.8 <sup>b</sup>
C17:0	189.2±1.2 <sup>d</sup>	198.3±1.4 <sup>c</sup>	228.3±15.6 <sup>a,b</sup>	239.7±28.7 <sup>a</sup>	261.6±15.3 <sup>a</sup>	217.2±6.9 <sup>b</sup>
C17:1 <i>n</i> -7	61.3±1.4 <sup>d</sup>	66.2±0.8 <sup>c</sup>	71.2±1.1 <sup>b</sup>	79.7±4.9 <sup>a</sup>	82.4±3.7 <sup>a</sup>	69.8±5.4 <sup>b</sup>
C18:0	2803.0±134.3 <sup>d</sup>	3041.2±34.4 <sup>c</sup>	3597.6±304.4 <sup>a,b</sup>	3804.5±317.6 <sup>a</sup>	3836.1±96.4 <sup>a</sup>	3362.8±121.1 <sup>b</sup>
C18:1 <i>n</i> -9	6091.4±327.8 <sup>b,c</sup>	5884.6±281.0 <sup>c</sup>	7101.3±272.4 <sup>a</sup>	7278.2±278.5 <sup>a</sup>	7210.7±322.0 <sup>a</sup>	6209.6±186.3 <sup>b</sup>
C18:1 <i>n</i> -7	891.0±18.9 <sup>d</sup>	1377.2±16.0 <sup>b</sup>	1694.3±86.0 <sup>a</sup>	1778.8±92.3 <sup>a</sup>	1761.9±52.4 <sup>a</sup>	1063.5±74.5 <sup>c</sup>
C18:2 <i>cis</i> -9-12	693.9±21.4 <sup>c</sup>	712.7±13.6 <sup>b,c</sup>	812.4±23.7 <sup>a</sup>	852.7±41.0 <sup>a</sup>	868.9±38.2 <sup>a</sup>	738.5±26.0 <sup>b</sup>
C18:2 <i>trans</i> -9-12	339.9±28.9 <sup>c</sup>	345.5±18.5 <sup>c</sup>	423.5±18.9 <sup>a</sup>	441.4±20.3 <sup>a</sup>	440.9±32.5 <sup>a</sup>	377.3±19.8 <sup>b</sup>
C18:3 <i>n</i> -3	339.4±31.1 <sup>c</sup>	371.3±5.4 <sup>c</sup>	435.6±35.1 <sup>a,b</sup>	464.8±10.3 <sup>a</sup>	455.3±20.7 <sup>a</sup>	412.2±14.4 <sup>b</sup>
<i>cis</i> -9- <i>trans</i> -11 CLA	437.9±34.2 <sup>c</sup>	480.3±11.0 <sup>b</sup>	556.5±13.4 <sup>a</sup>	547.7±7.4 <sup>a</sup>	553.7±18.4 <sup>a</sup>	499.0±20.1 <sup>b</sup>
C20:0	< LOQ	63.0±3.6 <sup>c</sup>	73.0±11.3 <sup>b</sup>	73.8±3.2 <sup>b</sup>	80.9±4.3 <sup>a</sup>	74.9±6.9 <sup>b</sup>
C20:1 <i>n</i> -9	< LOQ	< LOQ	48.1±5.6 <sup>b</sup>	51.1±5.3 <sup>a</sup>	50.1±5.2 <sup>a</sup>	< LOQ
C20:5 <i>n</i> -3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	44.9±0.6 <sup>a</sup>	45.2±1.1 <sup>a</sup>	< LOQ
C22:5 <i>n</i> -3	67.9±4.5 <sup>a</sup>	52.4±3.3 <sup>b</sup>	65.1±3.1 <sup>a</sup>	69.8±5.3 <sup>a</sup>	71.3±10.2 <sup>a</sup>	49.1±2.2 <sup>c</sup>
C22:6 <i>n</i> -3	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Values are means ± standard deviation (n=9). <sup>a,b,c,d</sup> Values in the same row with different letters are significantly different. LOQ: limit of quantification; CLA: conjugated linoleic acid. Only fatty acids contents higher than LOQ are reported.

Los valores son media ± desviación estándar (n=9). <sup>a,b,c,d</sup> Los valores en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas. LOQ: límite de cuantificación; CLA: ácido linoleico conjugado. Solo están recogidos aquellos ácidos grasos que presentan valores superiores al LOQ.

Table 4. Effect of the transmethylation temperature on the content of fatty acid methyl esters in bovine milk (mg L<sup>-1</sup> of milk) processed by the simple method.

Tabla 4. Efecto de la temperatura de transmetilación en el contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos in leche bovina (mg L<sup>-1</sup> de leche) procesada mediante el método abreviado.

Fatty acid	Transmethylation temperature		
	40 °C	60 °C	80 °C
C4:0	1987.2±60.5 <sup>b</sup>	2147.3±42.3 <sup>a</sup>	2073.4±53.1 <sup>a</sup>
C6:0	573.4±24.5 <sup>b</sup>	645.6±18.9 <sup>a</sup>	613.4±20.8 <sup>a,b</sup>
C8:0	362.1±12.5 <sup>b</sup>	404.2±5.6 <sup>a</sup>	412.2±9.4 <sup>a</sup>
C10:0	758.0±17.7 <sup>b</sup>	853.0±21.4 <sup>a</sup>	875.1±8.2 <sup>a</sup>
C12:0	871.8±23.5 <sup>b</sup>	1088.9±58.1 <sup>a</sup>	1094.9±29.4 <sup>a</sup>
C14:0	2329.9±96.5 <sup>b</sup>	2907.8±113.4 <sup>a</sup>	2916.5±96.6 <sup>a</sup>
C14:1 <i>n</i> -5	239.4±9.6 <sup>b</sup>	298.8±12.4 <sup>a</sup>	299.5±9.6 <sup>a</sup>
C15:0	222.5±13.4 <sup>b</sup>	270.8±9.0 <sup>a</sup>	271.8±8.6 <sup>a</sup>
C16:0	6141.7±507.3 <sup>b</sup>	7382.5±261.9 <sup>a</sup>	7373.1±238.8 <sup>a</sup>
C16:1 <i>n</i> -7	446.1±18.7 <sup>b</sup>	554.4±23.8 <sup>a</sup>	549.2±29.8 <sup>a</sup>
C17:0	189.2±16.5 <sup>b</sup>	217.6±6.9 <sup>a</sup>	219.2±7.7 <sup>a</sup>
C17:1 <i>n</i> -7	54.1±1.4 <sup>b</sup>	69.8±5.4 <sup>a</sup>	68.9±1.7 <sup>a</sup>
C18:0	2646.4±51.6 <sup>b</sup>	3362.9±121.1 <sup>a</sup>	3336.8±80.6 <sup>a</sup>
C18:1 <i>n</i> -9	5098.3±146.8 <sup>b</sup>	6429.6±186.3 <sup>a</sup>	6435.6±142.4 <sup>a</sup>
C18:1 <i>n</i> -7	1011.6±97.6 <sup>b</sup>	1083.5±74.5 <sup>a</sup>	1142.3±69.0 <sup>a</sup>
C18:2 <i>cis</i> -9-12	581.4±18.4 <sup>b</sup>	738.5±26.0 <sup>a</sup>	734.7±26.0 <sup>a</sup>
C18:2 <i>trans</i> -9-12	303.2±13.0 <sup>b</sup>	377.3±9.8 <sup>a</sup>	377.6±12.4 <sup>a</sup>
C18:3 <i>n</i> -3	312.2±9.5 <sup>b</sup>	392.2±14.4 <sup>a</sup>	392.1±8.8 <sup>a</sup>
<i>cis</i> 9- <i>trans</i> 11 CLA	413.2±12.1 <sup>b</sup>	499.0±20.2 <sup>a</sup>	406.6±13.1 <sup>b</sup>
C20:0	58.4±5.4 <sup>c</sup>	74.8±7.1 <sup>a</sup>	65.7±1.0 <sup>b</sup>
C20:1 <i>n</i> -9	< LOQ	45.6±1.4 <sup>b</sup>	54.3±4.2 <sup>a</sup>
C20:5 <i>n</i> -3	< LOQ	46.1±3.7 <sup>a</sup>	48.4±2.3 <sup>a</sup>
C22:5 <i>n</i> -3	45.8±0.8 <sup>b</sup>	62.8±4.4 <sup>a</sup>	65.7±5.8 <sup>a</sup>
C22:6 <i>n</i> -3	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Values are means ± standard deviation (n=9). <sup>a,b,c</sup> Values in the same row with different letters are significantly different. LOQ: limit of quantification; CLA: conjugated linoleic acid. Only fatty acids contents higher than LOQ are reported.

Los valores son media ± desviación estándar (n=9). <sup>a,b,c</sup> Los valores en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas. LOQ: límite de cuantificación; CLA: ácido linoleico conjugado. Solo están recogidos aquellos ácidos grasos que presentan valores superiores al LOQ.

Table 5. Effect of the transmethylation time at 60 °C on the content of fatty acid methyl esters in bovine milk (mg L<sup>-1</sup> of milk) processed by the simple method.Tabla 5. Efecto del tiempo de transmetilación a 60 °C en el contenido de ésteres metílicos de ácidos grasos en leche bovina (mg L<sup>-1</sup> de leche) procesada mediante el método abreviado.

Fatty acid	Time of transmethylation						
	30 min	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	
C4:0	1010.6±105.4 <sup>d</sup>	1976.4±97.3 <sup>a</sup>	2108.2±64.9 <sup>a</sup>	1851.9±14.0 <sup>b</sup>	1568.6±35.6 <sup>c</sup>	852.2±63.5 <sup>d</sup>	
C6:0	474.8±43.4 <sup>c</sup>	750.9±51.3 <sup>a</sup>	805.4±25.4 <sup>a</sup>	652.1±20.3 <sup>b</sup>	437.4±45.3 <sup>c</sup>	364.3±74.2 <sup>c</sup>	
C8:0	365.8±13.5 <sup>b</sup>	383.9±8.4 <sup>a</sup>	396.1±7.9 <sup>a</sup>	389.9±12.6 <sup>a</sup>	362.1±10.5 <sup>b</sup>	358.7±16.2 <sup>b</sup>	
C10:0	771.1±28.5 <sup>b</sup>	808.8±32.5 <sup>ab</sup>	819.6±14.6 <sup>a</sup>	829.4±19.5 <sup>a</sup>	758.0±40.2 <sup>b</sup>	752.6±26.4 <sup>b</sup>	
C12:0	986.6±65.2 <sup>b</sup>	986.2±35.7 <sup>b</sup>	1230.3±117.6 <sup>a</sup>	1216.8±36.2 <sup>a</sup>	977.9±84.9 <sup>b</sup>	995.3±92.1 <sup>b</sup>	
C14:0	2651.1±59.9 <sup>b</sup>	2710.3±250.8 <sup>b</sup>	3276.8±371.0 <sup>a</sup>	3256.6±156.1 <sup>a</sup>	2580.6±228.0 <sup>b</sup>	2581.4±226.4 <sup>b</sup>	
C14:1 <i>n</i> -5	286.1±7.9 <sup>bc</sup>	308.9±30.0 <sup>b</sup>	361.7±4.9 <sup>a</sup>	323.4±10.4 <sup>b</sup>	272.5±20.8 <sup>c</sup>	285.6±19.0 <sup>bc</sup>	
C15:0	246.0±11.9 <sup>c</sup>	257.3±26.0 <sup>bc</sup>	322.3±13.2 <sup>a</sup>	269.0±14.6 <sup>b</sup>	236.0±22.2 <sup>c</sup>	239.9±22.8 <sup>c</sup>	
C16:0	6580.1±41.6 <sup>d</sup>	6905.5±541.4 <sup>c</sup>	7749.3±609.9 <sup>b</sup>	8097.5±229.4 <sup>a</sup>	6363.0±582.7 <sup>d</sup>	6492.7±563.4 <sup>d</sup>	
C16:1 <i>n</i> -7	553.1±23.3 <sup>b</sup>	571.5±23.5 <sup>b</sup>	616.6±49.1 <sup>a</sup>	634.5±56.3 <sup>a</sup>	516.6±45.1 <sup>c</sup>	545.1±31.0 <sup>bc</sup>	
C17:0	189.2±12 <sup>c</sup>	200.5±11.8 <sup>b</sup>	239.4±10.3 <sup>a</sup>	241.9±17.4 <sup>c</sup>	184.0±16.1 <sup>c</sup>	192.7±15.9 <sup>bc</sup>	
C17:1 <i>n</i> -7	66.2±0.8 <sup>b</sup>	68.5±4.3 <sup>b</sup>	76.3±5.9 <sup>a</sup>	79.2±04.9 <sup>a</sup>	63.5±3.8 <sup>c</sup>	62.9±5.7 <sup>c</sup>	
C18:0	2803.0±22.8 <sup>c</sup>	2952.6±278.1 <sup>c</sup>	3663.3±236.6 <sup>a</sup>	3238.7±85.7 <sup>b</sup>	2784.2±277.4 <sup>c</sup>	2840.6±221.5 <sup>c</sup>	
C18:1 <i>n</i> -9	6061.4±79.1 <sup>bc</sup>	6320.2±422.0 <sup>b</sup>	7148.8±694.2 <sup>a</sup>	7007.3±148.6 <sup>a</sup>	5868.3±408.3 <sup>c</sup>	6117.1±497.8 <sup>bc</sup>	
C18:1 <i>n</i> -7	1377.2±16.1 <sup>c</sup>	1477.4±97.3 <sup>b</sup>	1629.9±186.5 <sup>a</sup>	1438.3±16.9 <sup>b</sup>	1347.2±114.2 <sup>c</sup>	1385.6±112.8 <sup>c</sup>	
C18:2 <i>cis</i> -9-12	712.7±13.6 <sup>bc</sup>	755.0±59.6 <sup>b</sup>	842.1±27.6 <sup>a</sup>	833.2±36.5 <sup>a</sup>	685.7±42.1 <sup>c</sup>	716.3±57.4 <sup>bc</sup>	
C18:2 <i>trans</i> -9-12	345.5±8.4 <sup>bc</sup>	364.8±24.8 <sup>b</sup>	393.4±38.2 <sup>a</sup>	410.2±27.4 <sup>a</sup>	329.0±15.1 <sup>c</sup>	347.5±29.9 <sup>bc</sup>	
C18:3 <i>n</i> -3	375.3±5.3 <sup>b</sup>	414.2±31.6 <sup>a</sup>	438.6±29.6 <sup>a</sup>	433.6±10.2 <sup>a</sup>	363.3±22.7 <sup>b</sup>	371.9±35.1 <sup>b</sup>	
<i>cis</i> -9- <i>trans</i> -11 CLA	484.3±15.8 <sup>a</sup>	494.9±47.7 <sup>a</sup>	501.2±35.8 <sup>a</sup>	484.2±7.6 <sup>a</sup>	349.4±28.1 <sup>b</sup>	313.0±22.4 <sup>b</sup>	
C20:0	< LOQ	56.5±2.9 <sup>b</sup>	66.9±5.2 <sup>a</sup>	60.5±3.2 <sup>a</sup>	55.2±4.8 <sup>b</sup>	< LOQ	
C20:1 <i>n</i> -9	< LOQ	45.9±2.4 <sup>d</sup>	46.1±4.2 <sup>d</sup>	64.6±6.6 <sup>c</sup>	121.7±12.2 <sup>b</sup>	144.5±7.2 <sup>a</sup>	
C20:5 <i>n</i> -3	< LOQ	44.9±0.9 <sup>a</sup>	46.6±0.8 <sup>a</sup>	< LOQ	< LOQ	< LOQ	
C22:5 <i>n</i> -3	68.3±2.8 <sup>a</sup>	71.7±4.1 <sup>a</sup>	69.8±5.2 <sup>a</sup>	62.5±2.7 <sup>b</sup>	62.5±8.5 <sup>b</sup>	69.6±0.8 <sup>a</sup>	
C22:6 <i>n</i> -3	< LOQ	< LOQ	41.9±4.0 <sup>a</sup>	41.3±1.9 <sup>a</sup>	< LOQ	< LOQ	

Values are means ± standard deviation (n=9). <sup>a,b,c,d</sup> Values in the same row with different letters are significantly different. LOQ: limit of quantification; CLA: conjugated linoleic acid. Only fatty acids contents higher than LOQ are reported.

Los valores son media ± desviación estándar (n=9). <sup>a,b,c,d</sup> Los valores en la misma fila con letras diferentes presentan diferencias estadísticamente significativas. LOQ: límite de cuantificación; CLA: ácido linoleico conjugado. Solo están recogidos aquellos ácidos grasos que presentan valores superiores al LOQ.

Table 6. Recovery factors at three addition levels (Std3, Std4 and Std5); repeatability and intermediate precision (RSD, %) for the simple method.

Tabla 6. Recuperaciones a tres niveles de adición (Std3, Std4 y Std5); repetitividad y precisión intermedia (RSD, %) para el método abreviado.

Fatty acid	Recovery Std3 (%)	Recovery Std4 (%)	Recovery Std5 (%)	Repeatability (RSD, %)	Intermediate precision (RSD, %)
C4:0	79.66	87.92	74.18	7.00	8.01
C6:0	80.26	88.11	74.47	3.95	4.59
C8:0	85.87	88.22	78.67	2.80	6.52
C10:0	87.74	91.31	79.18	2.96	9.62
C12:0	88.53	91.59	81.07	3.37	10.69
C14:0	88.35	93.32	84.20	3.52	10.82
C14:1 <i>n</i> -5	89.46	92.01	84.31	3.29	9.84
C15:0	88.59	90.71	84.05	3.51	8.24
C16:0	91.59	93.05	90.09	2.88	9.85
C16:1 <i>n</i> -7	91.67	93.71	86.80	2.89	9.01
C17:0	99.23	100.34	91.71	4.13	7.91
C17:1 <i>n</i> -7	90.42	92.63	86.52	2.27	3.09
C18:0	91.20	91.49	88.26	2.47	10.94
C18:1 <i>n</i> -9	89.89	91.24	80.86	2.13	10.41
C18:1 <i>n</i> -7	95.00	90.46	80.37	1.90	10.87
C18:2 <i>cis</i> -9-12	88.31	88.77	85.36	2.26	9.65
C18:2 <i>trans</i> -9-12	86.96	91.30	83.69	3.75	9.75
C18:3 <i>n</i> -3	88.39	94.49	79.95	1.72	9.41
<i>cis</i> 9- <i>trans</i> 11 CLA	94.10	93.26	89.59	1.87	8.83
C20:0	89.40	91.74	82.61	1.83	4.39
C20:1 <i>n</i> -9	91.67	93.13	78.61	3.39	10.54
C20:5 <i>n</i> -3	87.37	92.71	77.43	1.04	8.57
C22:5 <i>n</i> -3	89.96	94.19	87.16	2.07	3.16
C22:6 <i>n</i> -3	87.10	93.96	87.52	3.28	4.79

LA: conjugated linoleic acid.

CLA: ácido linoleico conjugado

Table 7. Fatty acid methyl ester amounts (mg L<sup>-1</sup> of milk) in bovine milk obtained by applying both conventional and simple methods.

Tabla 7. Cantidades de ésteres metílicos de ácidos grasos (mg L<sup>-1</sup> de leche) en leche bovina obtenidas aplicando ambos métodos, convencional y abreviado.

Fatty acid	Simple method	Conventional method	<i>P</i>
C4:0	2028.2±149.6	2343.0±137.5	**
C6:0	723.6±33.9	853.2±58.5	***
C8:0	520.1±15.5	494.1±14.4	ns
C10:0	1060.2±22.6	1004.4±52.7	ns
C12:0	1039.4±37.7	933.2±29.7	**
C14:0	3314.1±263.1	2964.1±121.9	*
C14:1 <i>n</i> -5	445.8±37.5	405.6±15.8	ns
C15:0	291.5±22.5	249.8±10.4	**
C16:0	8252.8±447.1	7053.7±296.4	***
C16:1 <i>n</i> -7	861.8±31.6	706.1±23.1	***
C17:0	270.9±18.9	211.4±19.8	***
C17:1 <i>n</i> -7	125.9±10.8	65.7±6.4	***
C18:0	2512.8±165.1	2015.0±40.6	***
C18:1 <i>n</i> -9	8196.7±480.2	6738.4±253.0	***
C18:1 <i>n</i> -7	3335.3±264.9	2736.9±132.9	***
C18:2 <i>cis</i> -9-12	906.2±80.3	735.7±24.4	***
C18:2 <i>trans</i> -9-12	528.2±50.2	421.7±12.6	**
C18:3 <i>n</i> -3	409.1±39.8	341.2±12.9	**
<i>cis</i> 9- <i>trans</i> 11 CLA	545.1±35.5	175.4±11.7	***
C20:0	65.5±4.5	<LOQ	—
C20:1 <i>n</i> -9	89.6±7.9	100.3±13.9	ns
C20:5 <i>n</i> -3	46.3±4.4	<LOQ	—
C22:5 <i>n</i> -3	54.6±4.7	<LOQ	—
C22:6 <i>n</i> -3	41.4±3.6	<LOQ	—

Values are means ± standard deviation (n=9). ns, not significant (P>0.05), \*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001. LOQ: limit of quantification; CLA: conjugated linoleic acid. Only fatty acids contents higher than LOQ are reported.

Los valores son media ± desviación estándar (n=9). ns, no significativas (P>0,05), \*P<0,05, \*\*P<0,01, \*\*\*P<0,001. LOQ: límite de cuantificación; CLA: ácido linoleico conjugado. Solo están recogidos aquellos ácidos grasos que presentan valores superiores al LOQ.





## V. CONCLUSIONES



1. Es posible desarrollar alimentos funcionales, partiendo de alimentos de consumo habitual como la carne, y mejorando sus propiedades nutricionales a través de procesos tecnológicos, reformulando dichos productos con ingredientes. En el caso concreto de los alimentos cárnicos funcionales obtenidos por modificación de la formulación tradicional, los nuevos ingredientes deben ser incluidos de un modo adecuado. En este sentido, la utilización de aceites pre-emulsionados permite obtener productos con un mejor perfil lipídico, menos grasa, colesterol, calorías y sodio, además de con una buena estabilidad al cocinado, y al almacenamiento en atmósfera modificada. Tal y como se ha demostrado durante esta tesis doctoral, es posible además que estos nuevos productos obtengan una aceptabilidad por parte del consumidor similar a la de los productos tradicionales.
2. En el desarrollo de alimentos con nuevas formulaciones puede ser necesario corregir pequeñas desviaciones en las características del producto final para hacerlos más similares a los productos tradicionales. Para ello, el diseño de experimentos, junto con la metodología de superficies de respuesta, pueden constituir una herramienta de gran utilidad para la determinación de las formulaciones óptimas de estos productos. Así, en nuestro caso concreto, conseguimos obtener una textura óptima para las hamburguesas enriquecidas en lípidos saludables y fibra utilizando estas herramientas estadísticas, para obtener las condiciones de elaboración y formulación adecuada de transglutaminasa y caseinato en el producto final.
3. El pescado procedente de la acuicultura en general y en concreto el rodaballo, constituye una excelente fuente de ácidos grasos  $n-3$ , pero presenta valores más altos de grasa, colesterol y ácidos grasos saturados y monoinsaturados que su homólogo salvaje, además de una relación  $n-3/n-6$  mucho menor que la de éste último. Por lo tanto, el pescado procedente de la acuicultura no debe considerarse un sustituto exacto del pescado procedente de la pesca extractiva. Para poder llegar a ser considerado como tal, en el sector de la acuicultura debería estudiarse la posibilidad de variar la alimentación de los peces para así

mejorar su composición nutricional y lipídica, consiguiendo que se aproxime más a la de los ejemplares salvajes.

4. Es posible y necesario desarrollar nuevos métodos de análisis de análisis para la determinación de compuestos de interés nutricional, que sustituyan a los laboriosos métodos tradicionales. Especialmente en este momento, en el que las empresas del sector alimentario están cada vez más preocupadas por ofrecer productos más saludables. En este trabajo se desarrolló un novedoso método abreviado para la determinación de ácidos grasos en leche que presenta unos aceptables porcentajes de recuperación y precisión. Además, mediante éste método se disminuye el riesgo de contaminación y de pérdida de muestra durante el procesado.